

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin an
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Hein



**Untersuchungen zur Osteointegration einer nanopartikulären Hydroxylapatitkeramik
in Verbindung mit verschiedenen Knochengeweben am Kaninchen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mathias Schulz

geboren am: 16.07.1977 in Karl-Marx-Stadt

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Hein

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr. med. H. Reichel, Ulm
2. Univ.-Prof. Dr. med. W. Hein, Halle

Datum der Verteidigung : 16.10.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014924

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014924>]

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet.

Knochendefekte stellen in der Skelettchirurgie eine besondere Herausforderung dar. Als „Goldstandard“ der Behandlung gilt bis zum heutigen Tag das Auffüllen mit patienteneigener Spongiosa. Vorwiegend aus dem Beckenkamm gewonnen, wird zur Entnahme des Knochengewebes aber ein Zweiteingriff notwendig, der zusätzliche Risiken wie Blutungen, Infektionen, Hypästhasien und Schmerzen an der Entnahmestelle in sich birgt. Alternativ steht heute allogenes Knochengewebe zur Verfügung. Allogener Knochen ist zwar in ausreichender Menge vorhanden, jedoch birgt auch diese Möglichkeit der Therapie Probleme. Im Vordergrund steht dabei ihre geringere biologische Wertigkeit durch verschiedene Desinfektionsmaßnahmen. Gleichzeitig verbleibt immer auch ein Restrisiko für Infektionen mit dem HI- Virus oder Hepatitis C. Auch wirtschaftliche Aspekte beim Führen und Unterhalten einer Knochenbank spielen eine Rolle. Aus diesen Gründen hat sich heute die Behandlung mit Knochenersatzstoffen etabliert. Zu den wichtigsten Vertretern zählt das Hydroxylapatit. Seine ambivalenten Eigenschaften sind im Laufe der Jahre wiederholt getestet und beschrieben worden. Vorteilhaft fallen seine Verfügbarkeit und Sterilität auf. Als Nachteil muss seine geringe Resorbierbarkeit hingenommen werden.

Seit geraumer Zeit ist ein nanopartikulärer Hydroxylapatit (*Ostim*[®], Firma *Osartis GmbH & Co.KG*) auf dem Markt, der durch seine spezielle Konzeption genau dieses Defizit ausgleichen soll. In der vorliegenden Arbeit wurde in einer tierexperimentellen Versuchsanordnung geprüft, wie der neue Knochenersatzstoff allein und bei Augmentation mit autogenem oder allogenen Knochengewebe im knöchernen Lager integriert wird. Bei 60 weissen Neuseeländer- Kaninchen wurde an den distalen Femora ein Defekt kritischer Größe gesetzt. Die Zeitabstände der histologischen und histomorphometrischen Untersuchung lagen zwischen zwei und zwölf Wochen. Primär konnte eine verstärkte Knochenneubildung nach den ersten sechs Wochen post operationem für *Ostim*[®] allein gemessen werden. Im weiteren Verlauf zeigten sich nur noch vereinzelt signifikante Unterschiede, die jedoch als zufällig angesehen werden müssen. Es konnte kein kontinuierlicher Trend verbesserter Einheilung oder Resorption für eine der beiden Augmentationsgruppen evaluiert werden. Histologisch zeigten sich keinerlei Abstoßungsreaktionen oder Entzündungen, die Implantate wiesen eine gute Biokompatibilität auf. Eine restlose Resorption konnte nicht beobachtet werden, auch nach zwölf Wochen ließ sich das Hydroxylapatit im Defektbereich nachweisen. *Ostim*[®] folgt damit der allgemein bekannten Eigenschaft des Hydroxylapatits- der nur marginalen Resorption. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Eigenschaften von *Ostim*[®] bei Anwendung mit verschiedenen Knochengeweben an einem Tierdefektmodell unverändert bestehen blieben.

Schulz, Mathias: **Untersuchungen zur Osteointegration einer nanopartikulären Hydroxylapatitkeramik in Verbindung mit verschiedenen Knochengeweben am Kaninchen.** Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 77 S., 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Indikation und Anforderungen an Knochenersatzsubstanzen	2
2.1.1	Verfügbarkeit	2
2.1.2	Biokompatibilität	2
2.1.3	Biodegradation	3
2.1.4	Sterilität	3
2.1.5	Mechanische Eigenschaften	3
2.2	Mechanismen der Knochenregeneration	4
2.2.1	Osteokonduktion	4
2.2.2	Zellvermittelte Osteogenese	5
2.2.3	Osteoinduktion	6
2.3	Knochentransplantate	7
2.3.1	Autogene Knochentransplantate	10
2.3.2	Allogene Knochentransplantate	11
2.4	Knochenersatzmaterialien	12
2.4.1	Hydroxylapatit	14
2.4.2	Augmentation von Hydroxylapatit	16
2.4.3	Ostim [®]	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Versuchstiere	19
3.2	Versuchsanordnung	19
3.3	Implantate	20
3.3.1	Autogene Spongiosa	20
3.3.2	Allogene Spongiosa	21
3.3.3	Ostim [®]	21
3.4	Implantatanfertigung	21
3.5	Operativer Eingriff und Probengewinnung	22
3.5.1	Anästhesie	22
3.5.2	Operatives Vorgehen	22
3.5.3	Postoperative Kontrolle	23
3.5.4	Euthanasie und Explantation	23
3.6	Aufarbeitung der Proben zur histologischen Untersuchung	24
3.6.1	Fixierung und Entwässerung	24
3.6.2	Infiltration und Einbettung	24
3.6.3	Herstellung von Präparatschliffen	25
3.6.4	Dünnschlifftechnik	26
3.7	Histologische Färbungen	26

3.7.1	Ladewig- Färbung	26
3.7.2	Giemsa- Färbung	27
3.7.3	Masson-Trichrom-Goldner-Färbung	27
3.8	Auswertung	28
3.8.1	Histomorphometrie	28
3.8.2	Statistik	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Histologische Befunde	31
4.1.1	Zwei Wochen postoperativ	31
4.1.2	Vier Wochen postoperativ	33
4.1.3	Sechs Wochen postoperativ	37
4.1.4	Acht Wochen postoperativ	40
4.1.5	Zwölf Wochen postoperativ	44
4.1.6	Zusammenfassung der histologischen Befunde	47
4.2	Histomorphometrische Ergebnisse	48
4.2.1	Vergleiche der Anteile der Knochenfläche (in Prozent) im zeitlichen Verlauf	49
4.2.2	Vergleiche der Trabekeldicke (in μm) im zeitlichen Verlauf	50
4.2.3	Vergleich der Anzahl der Trabekel (pro mm) im zeitlichen Verlauf	51
4.2.4	Vergleich der Trabekel- Separation (in μm) im zeitlichen Verlauf	53
5	Diskussion	55
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
AB	autogener bzw. allogener Knochen
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
BV/TV	Knochenfläche/ Gesamtfläche
bzw.	beziehungsweise
C	Kortikalis
Ca	Calcium
CA	Kallus
ca.	cirka
CSD	critical-size-defect
CT	Bindegewebe
eCA	endostealer Kallus
Fa.	Firma
G	Ostim [®]
HA	Hydroxylapatit
HB	Lagerknochen
IGF	Insulin like Growth Factor
KM	Körpermasse
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NB	Geflechtknochen
nm	Nanometer
O	Osteoid
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGA	Polyglycolid
PLA	Polylactid
Po	Phosphat
RL	Resorptionslakune

ROI	region of interest
Tb.N	Trabekelanzahl
Tb.Sp	Trabekelseparation
Tb.Th	Trabekeldicke
TCP	Tricalciumphosphat
TGF β	Transforming growth factor β
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
u.a.	unter anderem

1 Einleitung

Die Behandlung von Knochendefekten ist in vielen Bereichen der Skelettchirurgie ein zentraler Aspekt der Therapie. Insgesamt wurden nach *Jerosch et al.* [50] im Jahr 1990 allein in Deutschland etwa 71 000 autogene und 25 000 allogene Knochentransplantationen vorgenommen. Goldstandard bei dieser Behandlung war bisher das autogene Spongiosatransplantat. Durch einen Zweiteingriff mit seinen Komplikationsmöglichkeiten und durch die Tatsache, dass gerade bei älteren Patienten die Reserven an Spongiosa begrenzt sind, ergibt sich die Notwendigkeit der Suche nach adäquaten Alternativen. Als Ersatzwerkstoff mit größerer Verfügbarkeit wurde in vielen Fällen ein allogenes Knochentransplantat verwendet. Es kann aber weder die gleichen mechanischen Eigenschaften noch die uneingeschränkte, immunologische Unbedenklichkeit des autogenen Spongiosatransplantates ersetzen. Zusätzlich müssen die Kosten, die allein zur Führung einer Knochenbank nötig sind, berücksichtigt werden [45]. Knochenersatzstoffe aus Kalziumphosphat können eine Alternative für bestimmte Einsatzzwecke sein. Seit ihre biologische Verträglichkeit nachgewiesen wurde [58], werden sie im klinischen Alltag im großen Umfang eingesetzt [85]. Dabei kommen Hydroxylapatit und das Trikalziumphosphat in ihrer Stöchiometrie den im menschlichen Knochen vorkommenden Kalziumverbindungen am nächsten [86, 97]. Zweck dieser Arbeit war es, die Eigenschaften feinkristalliner Hydroxylapatitkeramik mit autogenem als auch allogenen Knochengewebe am Tiermodell zu untersuchen. Für unsere Versuche verwendeten wir Ostim[®]. Dabei handelt es sich um einen feinputikulären, phasenreinen, vollsynthetischen Hydroxylapatit, der in einer gebrauchsfertigen Applikationsspritze vertrieben wird und als pastöse Substanz verabreicht werden kann.

Ziele der Untersuchung zu diesem Knochenersatzstoff waren:

1. Am Tiermodell Kaninchen den Verlauf der Einheilung von Ostim[®] allein, als auch
2. in Kombination mit autogenem und allogenen Knochen zu beobachten
3. und das Resorptionsverhalten sowie die Osteointegration von Ostim[®] histologisch qualitativ und histomorphometrisch quantitativ zu evaluieren.

Für die Untersuchung der knöchernen Einheilung wurden somit zu Beginn der Versuchsanordnung kurz gestaffelte und am Ende langfristige Abstände gewählt. Die Zeitspanne umfasste dabei insgesamt 12 Wochen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Indikation und Anforderungen an Knochenersatzsubstanzen

Knochendefekte können ab einer kritischen Größe und abhängig von ihren Lokalisationen, nicht spontan heilen und stellen somit ein klinisches Problem dar [1]. Solche ossären Defekte können z. B. bei komplexen Frakturen, Tumoren und Zysten auftreten oder aber angeboren sein [38, 72]. Zusätzlich wird bei bis zu 15 Prozent aller orthopädischen Operationen eine Knochentransplantation notwendig [5]. Zur Defektauffüllung werden heute autogene Knochenplastiken, allogener Spenderknochen oder aber Knochenersatzmaterialien verwendet. Zweck des Auffüllens solcher Defekte soll die mechanische Belastbarkeit und meist auch die Primärstabilität des Knochens sein. Beim Einbringen des Ersatzstoffes wird die Resorption mit Bildung eines adäquaten, körpereigenen Knochens, der dem physiologischen Remodeling des Körpers unterliegt, angestrebt. Kann die Substanz nicht resorbiert werden, soll eine anhaltende Stabilität durch Einwachsen des umgebenden Knochens erreicht werden [72].

Um diesen Erfordernissen gerecht zu werden, müssen an Substanzen zur Defektauffüllung zahlreiche Anforderungen gestellt werden und bestimmte Eigenschaften vorhanden sein. Einige werden nachfolgend näher erörtert.

2.1.1 Verfügbarkeit

Das Material sollte unabhängig von einem Spender sein. Es sollte kommerziell erhältlich und nicht kontaminiert sein sowie durch positive Eigenschaften hinsichtlich langfristiger Lagerung überzeugen. Sowohl universelle Verwendbarkeit als auch akzeptable Herstellungskosten sind weitere Eckpunkte, auch in Hinblick auf den zunehmenden Kostendruck im klinischen Alltag [2, 38].

2.1.2 Biokompatibilität

Darunter werden die Merkmale biologische Verträglichkeit, Toxizität und entzündungsfreie Knochenintegration subsumiert.

Nach *Williams* [108] bedeutet Biokompatibilität eines Materials, keine akute oder chronische Entzündungsreaktion hervorzurufen und die ordnungsgemäße Differenzierung des Gewebes in der unmittelbaren Umgebung des Implantates nicht zu verhindern.

Für nicht resorbierbare Knochenersatzmaterialien bedeutet das eine bindegewebs- und entzündungsfreie Knochenbindung. Auf die Biokompatibilität von degradierbaren Materialien ist dabei besonders zu achten, da sie den pH- Wert ihrer Umgebung verändern können, toxische

Bestandteile freisetzen und durch die Akkumulation ihrer Löslichkeitsprodukte schaden können [49].

2.1.3 Biodegradation

Unter Biodegradation versteht man den Abbau von in den Körper eingebrachten Implantaten. Dafür stehen grundsätzlich zwei Abbauewege zur Verfügung:

1. Chemische Lösung
2. Makrophagozytäre Phagozytose [25].

Eine Resorbierbarkeit sollte bei Ersatzmaterialien gegeben sein, deren mechanische Eigenschaften sich stark von denen des natürlichen Knochens unterscheiden. Bei Langzeitverbleib könnten sie sonst das Nachbargewebe gefährden [97]. Im mineralisierten Knochen findet ein ständiger Umbau statt, mit dem sich das Skelett an veränderte mechanische Belastungen anpassen kann [72, 89]. Die Geschwindigkeit der Biomaterial- Resorption sollte dem Remodeling angepasst sein. Eine im Vergleich zum Remodeling erhöhte Resorbierbarkeit würde zu einer beeinträchtigten Funktion als Leitgerüst führen und Abbauprodukte könnten durch ihre Anhäufung die Einheilungsphase behindern. Eine vergleichsweise verminderte Resorbierbarkeit wiederum könnte sich negativ auf den Aufbau normaler Knochenstrukturen auswirken und das Ersatzmaterial dauerhaft ausgrenzen [38, 68, 89].

2.1.4 Sterilität

Eingebrachte Materialien dürfen weder immunogen noch kanzerogen wirken. Ebenso sollte ein Übertragen von Krankheitserregern ausgeschlossen sein [38]. Autogenes Material bedarf keiner weiteren Sterilisationsbehandlung, allogenes Material wird weitestgehend durch seine Aufbereitungsschritte sterilisiert. Ein Restrisiko der Übertragung von Viren bleibt dennoch bestehen, wohlgleich es um ein Vielfaches geringer ist als eine Bluttransfusion [70]. Synthetische Materialien bieten, im Gegensatz dazu, den Vorteil problemlos steril hergestellt und gelagert werden zu können [11].

2.1.5 Mechanisches Verhalten

Beim Mechanischen Verhalten sind Primärstabilität und mechanische Belastbarkeit zu unterscheiden. Im Vordergrund steht die Primärstabilität beim Einbau von Ersatzmaterialien, gemeint ist damit eine über Wochen anhaltende mechanische Ruhe im Implantatbett. Relativbewegungen entlang der Kontaktzone im Implantat- oder Transplantatbett müssen dabei vermieden werden. Dadurch werden Ossifikationsvorgänge möglich, die zu einer primären, knöchernen Einheilung führen [89]. Allerdings beeinflussen Substanzen die sehr dicht und steif sind die Neubildung des umgebenden Knochens im Sinne eines anatomischen Remodelings

negativ, so dass es in einigen Bereichen zu Knochenverlusten und in anderen zu Verdichtungen kommen kann [73, 97]. In Bezug auf die mechanische Belastbarkeit haben sich die bisher als Knochenersatzmaterial verwendeten Keramiken als nachteilig erwiesen. Sie sind sehr spröde und brechen somit schnell, was ihren Gebrauch für belastete Knochenbereiche mit einem gewissen Risiko verbindet [18]. Die nachfolgende Abb. 2.1 nach Niedhart [72] veranschaulicht den Zusammenhang zwischen mechanischer Belastbarkeit in Abhängigkeit ihrer osteoinduktiven bzw. osteostimulativen Eigenschaften.

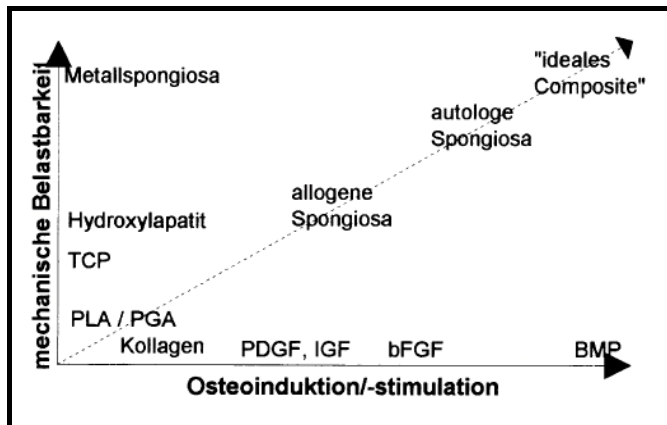


Abb. 2.1: Mechanische Belastbarkeit verschiedener Knochenersatzmaterialien in Abhängigkeit von Osteoinduktion/-stimulation nach Niedhart [72]. bFGF: basic Fibroblast Growth Factor, BMP: Bone Morphogenetic Growth Factor, IGF: Insulin like Growth Factor, PDGF: Platelet Derived Growth Factor, PGA: Polyglycolid,

2.2 Mechanismen der Knochenregeneration

Van Meekeren gelang im Jahre 1668 die erste xenogene Knochen transplantation am Menschen. Die erste autogene Knochen transplantation wurde 1820 von von Walter durchgeführt und Macewen bewältigte die erste in der Literatur beschriebene allogene Knochen transplantation 1878 [21, 36]. Seither sind weitere zahlreiche Materialien, Methoden und Wirkungsmechanismen des Knochenersatzes untersucht worden. Drei unterschiedliche biologische Mechanismen der Knochenregeneration lassen sich beim Einsatz von Knochenersatzsubstanzen beobachten.

2.2.1 Osteokonduktion

Unter konduktiven Eigenschaften versteht man die Fähigkeit als Leitgerüst für einen knöchernen Durchbau zu dienen.

Dabei spielt die Spungiosa eine wichtige Rolle, da sie in Bezug auf die Osteokonduktion eine Idealstruktur darstellt [14, 89]. Bei der Spungiosa beträgt der mittlere Durchmesser der Knochenbälkchen 220 μm . Die intertrabekulären, weitmaschig untereinander in Verbindung stehenden, Markräume haben eine Weite von 500 – 800 μm . Für die Porosität ergibt sich ein Wert zwischen 50 bis 90 Prozent im Gegensatz zur Kortikalis mit annähernd 10 Prozent. Diese interspongiosen Räume bilden die Voraussetzungen zum Einsprossen von Blutgefäßen und Begleitzellen. Deshalb kann hier ein Knochenanbau ohne vorausgegangene Resorption

erfolgen [12, 89]. In Bezug auf den Leitschieneneffekt resultiert damit eine Anregung einer vom knöchernen Lager ausgehenden Knochenregeneration [52]. Mit porösen Kalziumphosphatkeramiken versucht man diesen Mechanismus für die Knochenregeneration auszunutzen. Die Porosität solcher Keramiken ergibt sich durch kommunizierende, sphärische Hohlräume. Einwachsendes Bindegewebe erfordert einen Porendurchmesser von ca. 5 - 15 μm . Mineralisierte Knochengewebe brauchen einen Durchmesser von ca. 100 μm und osteonenähnliche Strukturen von ca. 200 μm . Für die knöcherne Durchbauung sind der Bestand an interporösen Verbindungen und deren Durchmesser von Bedeutung [60, 89].

Offenporöse Strukturen fördern das Durchdringen des Implantates mit Knochengewebe [58, 111]. Die vorwachsenden Gewebe, Gefäße und Begleitzellen haben dabei ihren Ursprung ausschließlich im knöchernen Anteil des Lagergewebes [52]. Kommen die eingegebenen Materialien weder mit Knochen noch mit Periost in Berührung, werden sie von Bindegewebe eingeschleitet und unterliegen nachfolgend keinem Remodeling [66]. Dadurch ergibt sich die Anforderung an das Lagergewebe, dem Implantat einen möglichst hohen Anteil an knöchernem Kontakt bereitzustellen. Unabhängig vom verwendeten Ersatzstoff kommt somit der Qualität des Implantatbettes größte Bedeutung zu [103].

Lexer [64] sollte dabei als erster den großen Einfluss des Implantatbettes auf die Integration des Ersatzstoffes erfassen. Drei Arten von Ersatzlagern werden nach ihm beschrieben:

1. ersatzstarkes Lager
2. ersatzschwaches Lager
3. ersatzunfähiges Lager.

Beim *ersatzstarken Lager* ist die Wahl des Knochentransplantates in Bezug auf seine Ersatzfähigkeit von keinerlei Bedeutung. Als *ersatzschwaches Lager* wurden periostlose Knochendefekte beschrieben, bei denen eine Substitution des eingebrachten Materials nur vom Rand aus zu beobachten war. Das *ersatzunfähige Lager* wird mit Instabilität beschrieben und als Beispiel wurde das Weichteillager im Muskel angeführt. Die Lagerqualitäten sind also bei den Überlegungen zur Auswahl des Ersatzstoffes mit einzubeziehen. Je ersatzschwächer das Lager ist, desto höhere Anforderungen sind an die biologische Potenz des Ersatzes zu stellen [30, 40].

2.2.2 Zellvermittelte Osteogenese

Zu diesem Vorgang der Knochenregeneration kommt es durch Verpflanzen von vitalen, knochenbildenden Zellen.

Der Wert dieses Mechanismus ist, verglichen mit der Osteokonduktion, in Bezug auf die Defektreparation höher einzustufen. Grund dafür sind die geringeren Anforderungen, die bei einer Transplantation an das Transplantatbett gestellt werden müssen. Eine große Rolle spielen die übertragenen Osteoblasten und deren Vorläuferzellen bei Verwendung autogenen Knochenmaterials. Spongiosatransplantate bieten durch einen höheren Anteil vitaler Zellen und durch die höhere Porosität die besseren Voraussetzungen gegenüber soliden Kortikallistransplantaten. Die zellvermittelte Osteogenese wirkt hier am effizientesten. Kortikaler Knochen funktioniert im Gegensatz dazu durch seinen geringeren Anteil an vitalen Osteoblasten und Vorläuferzellen eher als osteokonduktive Leitschiene [26, 51, 60, 67].

Anhand von komprimierten Spongiosatransplantaten konnte von *Burri* [15] aber auch gezeigt werden, dass die osteogenetische Potenz primär von der Menge frischer, unveränderter Grundsubstanz abhängt und weniger von den übertragenen lebenden Knochenzellen.

2.2.3 Osteoinduktion

Unter Osteoinduktion versteht man den stimulierenden Einfluss des Implantates auf die Differenzierung knochenbildender Zellen im Lagergewebe.

Verantwortlich dafür sind die in der Knochenmatrix enthaltenden, osteoinduktive Proteine, welche neben Wachstumsfaktoren und anderen organischen Verbindungen als nichtkollagener Bestandteil des Knochens existieren und durch Demineralisation des avitalen Knochenimplantates freigesetzt werden [60]. Die Abhängigkeit der induktiven Leistung vom Komplex der Mukopolysaccharide in der Grundsubstanz zur Differenzierung unspezifischer Mesenchymzellen beschrieb auch schon *Schweiberer* [92]. Diese Proteine wurden von *Urist* [102] als *bone morphogenetic protein* bezeichnet. Sie induzieren die Umwandlung pluripotenter Mesenchymzellen des Knochenlagers, welche mit aussprossenden Gefäßzellen in das Knochenimplantat gelangen, in knorpel- und knochenbildende Zellen. Diese Vorgänge können sowohl im Knochenlager (*orthotop*), als auch im Muskelgewebe und Fettgewebe (*heterotop*), beobachtet werden [72, 102].

Die anschließende Tab. 2.1 nach *Kübler* [60] zeigt das Verhalten von verschiedenen Knochenersatzmaterialien in Abhängigkeit der oben besprochenen Mechanismen.

Tab. 2.1: Osteogenetische Eigenschaften von Knochentransplantaten,- implantaten,- induktoren und- ersatzmaterialien (konventionelle allogene Knochenimplantate entsprechen kryokonservierten, lyophilisierten oder autoklavierten Knochenimplantaten nach Kübler [60].

	Osteokonduktion	Osteogenese durch vitale Zellen	Osteoinduktion
Autogene Knochentransplantate	+ / ++	+++	(+)
Bone Morphogenetic Proteins (BMP)	-	-	++++
Konventionelle, allogene Knochenimplantate	+ / ++	-	-
Demineralisierte, allogene Knochenimplantate	++	-	+
AAA-Knochenimplantate	++	-	++
Alloplastische Ersatzmaterialien	+++ / -	-	-

2.3 Knochentransplantate

Knochenersatzstoffe können nach verschiedenen Aspekten unterteilt werden. Legt man die Herkunft zu Grunde, so lässt sich eine Einteilung vornehmen in autogene, allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Transplantationsterminologie nach Kübler [60]

Autogenes Knochentransplantat	Verpflanzung innerhalb desselben Individuums
Allogenes Knochenimplantat	Verpflanzung zwischen Individuen derselben Spezies
Xenogenes Knochenimplantat	Verpflanzung zwischen Individuen verschiedener Spezies
Alloplastisches Knochenimplantat bzw. Knochenersatzmittel	Vollsynthetische Herstellung eines Biomaterials bzw. ausgiebige physikalische oder chemische Bearbeitung xenogener (speziesfremder) Gewebearten bzw. Gerüstbausteine

Wird die Charakterisierung hinsichtlich der Vitalität der Ersatzmittel vorgenommen, ergeben sich die Termini *Knochentransplantat* und *Knochenimplantat*. Beim *Knochentransplantat* werden Knochengewebe mit vitalen, knochenbildenden Zellen übertragen. Unter dem Begriff *Knochenimplantat* versteht man die Übertragung avitaler Materialien ins Körperinnere. Seit einigen Jahren des wissenschaftlich- medizinischen Fortschritts wird es immer schwieriger, die unterschiedlichen Bezeichnungen exakt zu gebrauchen. Als Beispiel soll hier das allogene Knochentransplantat angeführt werden:

Frisches, allogenes Knochengewebe wird im Gegensatz zur bekannten, allogenen Organtransplantation wegen der immunologischen (Abwehr)- Reaktion des Körpers (host versus graft) nicht mehr übertragen. Vor ihrer Transplantation werden allogene Knochengewebe einer physikalischen und/ oder einer chemischen Behandlung unterzogen. Dabei werden die immunologisch aktiv wirkenden, vitalen Zellen inaktiviert. Daraus würde sich nunmehr der Begriff allogenes Knochenimplantat ergeben. Aktuell wird es aber als allogenes Knochen- transplantat klassifiziert [60, 96].

Die Defektauffüllung erfolgte in Deutschland bei einer Umfrage unter 961 Kliniken im Jahr 1990 nach einer Umfrage von *Jerosch et al.* [50] rund 71000 Mal mit autogenem und rund 25000 Mal mit allogenen Knochengewebe. Transplantate zur Auffüllung von Knochenverlusten stellen Spongiosa, Kortikalis - mit und - ohne Gefäßanschluss, osteochondrale Transplantate sowie Knochenmarksaspirate dar. Diese unterschiedlichen Transplantatstrukturen beeinflussen ebenso wie der Entnahmeort die biologische Wertigkeit [96]. Die biologische Wertigkeit der Transplantate lässt sich nach *Muschler und Lane* [71] allgemein anhand von fünf Kriterien abschätzen. Diese werden in der Tab. 2.3 aufgeführt und kurz erläutert.

Tab. 2.3: Kriterien der Wertigkeit eines Knochentransplantates nach *Muschler u. Lane* [71]

Biologische Eigenschaft	Abkürzung	Transplantateffekt
Osteogene Aktivität	OG	Osteogenese durch übertragenen Zellen
Osteokonduktive Aktivität	OC	Leitschieneneffekt durch das Transplantat selbst
Osteoinduktive Aktivität	OI	Zelltransformation durch Faktoren der Knochenmatrix
Vaskularität	Vasc	Erhöhte Knochenregeneration durch schnelle Blutversorgung
Biomechanische Stabilität	Mech	Erhöhte Knochenregeneration durch schnelle Blutversorgung

Die unterschiedlichen Knochentransplantate werden den in Tab. 2.3 gestellten Kriterien hinsichtlich der biologischen Wertigkeit in unterschiedlichem Ausmaß gerecht. Verdeutlicht wird das durch die zweite Übersicht nach *Muschler und Lane* [71] in Tab. 2.4.

Tab. 2.4: Biologische Wertigkeit von Knochentransplantaten nach *Muschler und Lane* [71]

Transplantatart	OG	OC	OI	Mech	Vasc
<i>Autogen</i>					
Knochenmark	+	+/-	+	-	-
Spongiös	++	++	+	+	-
Kortikal	+	+	+	++	-
Vaskularisiert	++	+++	+	++	++
<i>Allogen</i>					
Spongiös	-	++	+	+	-
Kortikal	-	++	+	++	-
Demineralisiert	-	++	++	-	-

Xenogene Transplantate bleiben in dieser Übersicht unberücksichtigt.

Bis heute existieren aber keine allgemein gültigen Richtlinien zur Auswahl geeigneter Substanzen in Abhängigkeit von Art und Beschaffenheit des knöchernen Defektes [38].

Für den allgemeinen Einbau autologer Transplantate, ob kortikalen oder spongiösen Ursprunges, spielten für *Schweiberer* [93] drei substanzielle Faktoren eine entscheidende Rolle:

- Die mechanische Ruhe im Transplantatbett.
- Die Vaskularisationsfähigkeit des Lagers und des Transplantates.
- Der intensive Kontakt des Transplantates mit dem Transplantatbett.

Sind diese Faktoren erfüllt, wird das Knochentransplantat einem totalen Umbau unterworfen.

Der normale Einheilungsprozess eines Transplantates vollzieht sich dann nach *Burri* [15] über drei Phasen:

1. Vaskularisation des Transplantates
2. Osteogene Regeneration
3. Funktionelle Adaptation.

Die Einheilung des Transplantates beginnt mit der (Re)- Vaskularisierung des Gewebes in Form einer Angiogeneese, einhergehend mit einer Entzündungsreaktion aus den umgebenden Weichteilen und/ oder dem lokalen Knochen. Zum Knochenabbau kommt es durch Osteoklasten und Makrophagen. Durch diese Zellen werden gleichzeitig Wachstumsfaktoren freigesetzt. Stimuliert werden damit ortsständige Osteoblasten und nicht- determinierte Mesenchym-

zellen. Einsprossenden Gefäße und Knochengewebe, zu einem geringen Anteil auch von den überlebenden Osteoblasten aus expandierend, besiedeln die ehemaligen Markräume. Der schleichende Ersatz vollzieht sich dabei während dieser Umbauvorgänge längs der Transplantatachse vom angrenzenden Knochengewebe aus zur Mitte des Knochentransplantats [13, 83].

Der neue Knochen formiert sich auf den transplantierten Trabekeln und dringt in die kortikalen Anteile des Transplantates ein. Gleichzeitig kommt es zur Ausbildung von Brückenkallus zu den nekrotischen Spongiosabälkchen. Beides dient vermutlich der raschen mechanischen Stabilisierung [38, 83].

Der neu entstandene Knochen und die avitalen Trabekel des Transplantates werden anschließend im Zuge des Remodelings umgebaut. Bewerkstelligt wird dies wiederum mit Osteoklasten, Monozyten und Makrophagen. Somit kommt es wieder zu einem osteonal aufgebauten Knochen. [13, 83, 93].

Die dabei entstehende Trabekelarchitektur ist abhängig von der einwirkenden Belastung [110]. Der Umbau eines Transplantates ist nur dann möglich, wenn das Transplantat ernährt wird. Ein wichtiger Aspekt der Einheilung von Transplantaten ist dabei die Durchblutung des Defektlagers [3, 93].

2.3.1 Autogene Knochentransplantate

Den höchsten therapeutischen Wert haben bei der Knochen transplantation die autogenen Knochengewebe [40, 67]. Autologe Spongiosatransplantate werden aus diesem Grund auch als „golden standard“ im Vergleich zu anderen Verfahren der Defektbehandlung bezeichnet [51, 59]. Bei Verwendung von autogenen Spongiosatransplantaten kommen alle drei wesentlichen Knochenregenerationsmechanismen zur Anwendung:

- die osteoblastäre Osteogenese,
- die osteoinduktive Osteogenese und
- die osteokonduktive Osteogenese [96].

Im Detail ergibt sich die osteoblastäre Wirkung durch die in der Eigenspende überlebenden Osteoblasten und Osteozyten. Neben der Bereitstellung von osteoinduktiven Proteinen und Wachstumsfaktoren liegt ein sicherer Vorteil der autogenen Knochen transplantation auch in der osteokonduktiven Wirkung der natürlichen Knochenmatrix [9].

Zahlreiche Nachteile schmälern jedoch heute den therapeutischen Gewinn beim Einsatz autogener Transplantate. Autogene Spongiosa bietet den Vorteil einer großen biologischen Potenz, beinhaltet aber den Makel der fehlenden Primärstabilität [44]. Weiterhin zählen allgemein dazu: Ein zweiter Eingriff am Beckenkamm des Patienten mit seinen intra- und postope-

rativen Risiken wie Nerven- und Gefäßverletzungen, Wundheilungsstörungen, Narbenbildung, Infektionen sowie einer zusätzlichen Schmerzbelastung. Die Komplikationsrate bei diesen Transplantationen kann bis zu 10 Prozent betragen [5, 38].

Wippermann [109] berichtet in seiner Analyse von 1191 Spongiosaentnahmen am Beckenkamm von anhaltenden Beschwerden der Patienten, die auch nach einem Jahr noch im Entnahmebereich festzustellen waren. Hauptbeschwerden waren demnach bei 89 Patienten, die an der Fragbogenaktion teilnahmen, die Wetterfühligkeit (30%), Belastungsschmerz (26%), ein Taubheitsgefühl im Narbenbereich durch Läsion des Nervus cutaneus femoris lateralis (20%), Bewegungsschmerzen (18%), Ruheschmerzen (8%) und kosmetische Beeinträchtigungen durch Stufen und Konturunregelmäßigkeiten der Beckenkämme.

Ebenso besteht nur eine begrenzte Verfügbarkeit und Qualität, gerade bei älteren Menschen [5].

2.3.2 Allogene Knochentransplantate

Als gute Alternative zum autogenen Knochenersatz gilt die Transplantation allogenen Knochens. Bei dieser Art des Knochens handelt es sich um Material eines anderen Individuums derselben Spezies.

Diese Art des Knochenersatzes steht dann im Vordergrund, wenn große Defekte aufgefüllt und überbrückt werden müssen, denn hierbei stoßen die autogenen Knochentransplantate an die Grenzen ihrer Verfügbarkeit. Problematisch sind dabei die Entnahme großer Transplantate bei Patienten im schlechten Allgemeinzustand, bei Schwerverletzten und Kindern. Durch die damit verbundene Ausweitung des Operations- und Gewebetraumas steht schlussendlich ein oft nicht vertretbarer Zweiteingriff zur Disputation [103].

Die ossäre Regenerationsleistung des allogenen Knochentransplantates beruht auf dessen osteokonduktiver und osteoinduktiver Potenz, die zu einem Transplantateinbau, schleichenen Abbau und Ersatz führen. Die zellulär-osteogenetische Komponente spielt dabei keine Rolle, da durch verschiedene Verfahren der Aufbereitung dieser Transplantate, wie zum Beispiel Kältekonservierung, Gefriertrocknung (Lyophilisation) und Autoklavierung, die zellulären Bestandteile zugrunde gehen. Durch die Tiefkühlung wird ein fast vollständiger Zelltod herbeigeführt [103].

Weltweit finden unter den allogenen Knochentransplantaten am häufigsten die kryokonservierten oder lyophilisierten Transplantate ohne zusätzliche chemische Aufbereitung Verwendung [60]. Trotz guter experimenteller und klinischer Ergebnisse nach Einsatz allogener Knochentransplantate besteht die Gefahr einer Übertragung infektiöser Erreger bei alleiniger Kry-

okonservierung. Hierzu gehören eine bakterielle Kontamination, die Übertragung von Herpesviren und die besondere Gefahr der Kontamination mit HI- Viren durch die diagnostische Lücke bei unterschiedlich langen Serokonversionen nach erfolgter Infektion des Knochen-spenders [38, 39, 56, 82].

Zusätzlich verursachen die Antigene des MHC (major histocompatibility complex) auf der Zelloberfläche eines unbehandelten allogenen Transplantates eine zelluläre Immunantwort des Empfängerorganismus mit Abstoßungsreaktion [34]. Kollagen und Proteoglykane können dabei als Matrixbestandteile des Allografts ebenfalls eine geringe Immunantwort auslösen [20, 47].

Die Problematik allogener Transplantate wird aber auch bei Betreiben einer Knochenbank deutlich, deren Aufwand dabei häufig unterschätzt wird. Es müssen die Kosten der technischen Voraussetzung genauso berücksichtigt werden wie die des personellen Aufwandes. Dieser Aufwand muss sowohl für das Bereitstellen der allogenen Spongiosa als auch für das Spenderscreening betrieben werden, welches seinerseits als wesentliches Problem auftritt [45].

Die Summe der genannten Gründe mündet in der Diskussion über unterschiedliche Sterilisationsverfahren allogener Transplantate und zunehmend auch über den Einsatz der alloplastischen Knochenersatzstoffe.

2.4 Knochenersatzmaterialien

Die Entwicklung der alloplastischen Knochenersatzstoffe führte zu unterschiedlichen Substanzen mit verschiedenartiger chemischer Natur, Struktur, Zusammensetzung und biologischen Verhalten [96].

Unter dem Begriff der Knochenersatzmaterialien werden allgemein Implantatmaterialien verstanden, welche die Knochenbildung stimulieren, den körpereigenen Knochen nur vorübergehend ersetzen und sich im Verlauf der Knochenregeneration sukzessive auflösen sollen [51].

Nach *Rueger* [86] werden unter Knochenersatzmittel Biomaterialien verstanden, die als körperfremde Substanzen, nach Implantation in den menschlichen Körper, dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren (Teil-) Funktionen ersetzen.

Ziele der Therapie mit Biomaterialien gehen über den einfachen Ersatz des körpereigenen Gewebes hinaus. Im Mittelpunkt des Interesses liegen dabei speziell:

1. die Menge des neugebildeten Knochens
2. die Qualität des neugebildeten Knochens
3. die Zeitspanne, in der die Knochenneubildung und –heilung stattfinden und
4. die mechanische Belastbarkeit des Implantates.

Die ersten beiden Punkte führen zu einer Verbesserung der knöchernen Reparatur. Dabei kommt es zu einer Erhöhung der Knochenmasse und deren Reife am Defektort. Eine Beschleunigung der Knochenheilung durch ein Knochenersatzmittel hat neben der individuellen Bedeutung auch eine volkswirtschaftliche Größe. Es käme beim Einsatz von Knochenersatzmitteln zu einer deutlichen Reduktion der Kosten für die stationäre wie auch ambulante Behandlung. Ebenso könnten weitere Folgekosten wie Arbeitsunfähigkeit und Rentenansprüche deutlich gesenkt werden. Ein belastbares Implantat erleichtert zusätzlich das operativ-technische Vorgehen.

Die heute vorkommende Vielfalt an unterschiedlichen Knochenersatzmitteln lässt Einteilungen hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrem Wirkmechanismus und dem möglichen Indikationsbereich aufgrund der vorhandenen Heterogenität der Materialien nicht zu [86]. Eine Einteilung nach den Ausgangsverbindungen bzw. dem Herstellungsverfahren scheint jedoch möglich und wird nach *Rueger* [84] vorgenommen. Daran angelehnt wird unterschieden in:

- I. biologisch, organische Substanzen
- II. synthetische, anorganische Materialien
- III. synthetische, organische Verbindungen
- IV. Komposite.

Diese Einteilung beruht letztlich darauf, dass alle biologischen, organischen Substanzen aus der organischen Phase des Knochengewebes und die synthetischen, anorganischen Materialien theoretisch aus der anorganischen Phase des natürlichen Knochens gewonnen werden könnten. In Gruppe drei sind alle organischen Polymere zusammengefasst. Gruppe vier vereint alle Mischungen und Kombinationen von Substanzen der Klassen eins, zwei und drei [86].

Die Untergruppen werden in der Tab. 2.5 nach *Rueger* [86] dargestellt. Die Gruppe vier kann dabei aufgrund ihrer Vielfältigkeit von Kombinationen nicht systematisch dargestellt werden.

Tab. 2.5: Übersicht der Knochenersatzmittel nach *Rueger* [86]

Biologische, organische Substanzen	Knochenmatrices Knochenmatrixextrakte Extrahierte Knochenwachstumsfaktoren Chemotaktisch, proliferative, induktive, nicht knochenspezifische Faktoren
Synthetische, anorganische Substanzen	Monophasische, synthetische Verbindungen Hydrothermal aus Korallen bzw. Algen hergestellte Hydroxylapatitkeramik- Analoga Aus bovinen Knochen durch Sinterungs- oder Elutionsprozess gewonnene Hydroxylapatitkeramiken Mehrphasige Kalziumphosphatkeramiken, Biogläser oder mehrphasige Glaskeramiken Kalziumphosphathaltige Knochenzemente
Synthetische, organische Substanzen	Polyester (1.Homopolymere, 2. Kopolymere) Polyaminosäuren Polyanhydride Polyorthoester Polyphosphazene

Für unsere Versuchsanordnung verwendeten wir Ostim[®], welches in die große Gruppe der Hydroxylapatite gehört und auf die nachfolgend näher eingegangen wird.

2.4.1 Hydroxylapatit

Hydroxylapatit ist ein schwerlösliches, komplexes Salz $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$. Es gehört zu den anorganischen Bestandteilen des Knochens und macht dessen überwiegenden Anteil aus.

Als Bestandteil von Knochenersatzstoffen ist Hydroxylapatit biokompatibel im Knochen als auch im Weichteilgewebe [16, 33, 37, 41, 55, 74, 81]. Es gilt als atoxisch, nicht antigen und integriert sich vollständig in das körpereigene Knochengewebe [16, 75]. Schwere Entzündungsreaktionen sowie Abstoßungsreaktionen wurden nicht beobachtet [6, 33, 37, 55, 79]. In Langzeitstudien konnte zudem gezeigt werden, dass Hydroxylapatit auch nach mehreren Jahren gut vom Körper toleriert wird [37]. Nach seinem Einsatz heilen die Knochendefekte allgemein gut ab. In wenigen Fällen konnten aber nach *Frame* [33] bei dichten Hydroxylapatitkeramiken vereinzelt Fremdkörperriesenzellen beobachtet werden. Fremdkörperreaktionen blieben dabei jedoch aus.

Hydroxylapatit ist ein nicht bis sehr schwer resorbierbarer Knochenersatzstoff [16, 27, 55, 75, 79, 89] im Gegensatz zum Trikalziumphosphat, welches schnell abgebaut wird [86]. Einfluss auf die Biodegradation und damit auf die Resorption haben verschiedene Parameter: Zusammensetzung, Unreinheiten der Rohstoffe sowie deren Produktionsbedingungen wurden von *Renooij* [79] und *Eggli et al.* [28] untersucht. Ebenso haben auch nach *Bloemers* [7] die

Kristallinität, die Größe der Mikroporen und der Sinterungsprozess selbst einen Einfluss auf die Resorption von Kalzium-Phosphat-Keramiken.

Physikalische Einflussgrößen wie Dichte und Mikroporosität des Ersatzstoffes wurden auch von *de Groot* [22] mit dem Ergebnis untersucht, dass sie die Biodegradation dezidiert beeinflussen können. Dabei stellte er fest, dass die Kalziumphosphat- Verbindungen an ihren Grenzflächen zum Hydroxylapatit im wässrigen Milieu des Körpers umgesetzt werden. Kleine Unterschiede in deren chemischer Zusammensetzung haben darauf keinen Einfluss. Die wichtigsten Einflussgrößen der Bioresorption stellten in seinen Untersuchungen die Implantatstruktur im Sinne der Porosität mit der Porengröße der Keramik dar.

Eine Erklärung dafür findet man bei *Weinländer* [106]: Mikroporen erhöhen seiner Ansicht nach die Aufspaltungsrate an den Kristallgrenzen. Dabei werden kristalline Brückenbindungen des Kristallgefüges gelöst und die Einzelkristalle können entsprechend einfacher phagozytiert werden.

Gleiche Beobachtungen machten *Dingeldein et al.* [23], die eine Hydroxylapatit- Keramik in das spongiöse Knochenlager des Kaninchens implantierten. Dabei wies der Kristallverbund, wahrscheinliche durch fehlerhafte Sinterungsprozesse, Risse auf, die auf fehlerhafte Kristallbrücken beruhten. Nachfolgend zeigten sich dort Zeichen der Resorption und vermehrt Einzelkristalle, die von Makrophagen phagozytiert wurden. Die Gesamtkeramik wurde aber interessanter Weise nicht abgebaut. Es zeigten sich auch keine Osteoklasten, womit die Keramik keinem Remodeling zugeführt wurde.

Die These der Porosität wird allerdings nicht von allen Autoren gestützt. Dabei wird der Porosität keine auf den Abbau ausgerichtete Einflussnahme beigemessen, jedoch wurde aber ein starkes Vorwachsen des umgebenden Knochens in die porösen Implantate beobachtet [27, 28, 55, 79].

Die Resorptionsrate, die sich umgekehrt proportional zur mechanischen Stabilität verhält, wird somit durch viele Faktoren beeinflusst

Hydroxylapatit selbst hat eine gering mechanische Stabilität. Es ist aufgrund seiner spröden Eigenschaften für größere Biegekräfte ungeeignet und besitzt selbst keine Eignung als Prothesenmaterial. Hydroxylapatit wirkt jedoch osteokonduktiv aber nicht osteoinduktiv [32, 42, 95].

Die Druckfestigkeit kompakter Kalziumphosphatkeramiken liegt über der des kortikalen Knochens. Der Spongiosa gleichen diesbezüglich poröse Keramiken. Ihre Druckfestigkeit wird vom Volumenanteil der Poren bestimmt und steht in exponentieller Abhängigkeit.

Nach *Schenk* [89] ist eine Volumendichte von mindestens 50 Prozent erforderlich, um den physiologischen Belastungen in einem Implantatbett gerecht werden zu können.

2.4.2 Augmentation von Hydroxylapatit

Die Augmentation von Hydroxylapatit spielte auch in unseren Untersuchungen eine zentrale Rolle. In der Literatur führt sie, beschrieben mit verschiedenen Stoffen und Substanzen, zu unterschiedlichen Verhaltensmustern während seiner Degradation, Resorption und Inkorporation.

Normalerweise liegt die Rate an neu gebildetem Knochen mit $0,8 \mu\text{m/d}$ etwa im gleichen Bereich wie die der Knochenapposition von normalem Knochen mit $1,0 \mu\text{m}$ bis $1,4\mu\text{m/d}$ [46]. Bei der Augmentation mit autogener Spongiosa stellten *Block und Kent* [6] in ihren Untersuchungen fest, dass sich die Knochenneubildung schneller vollzog. Ebenso beschreiben *Boeck-Neto et al.* [8] eine gesteigerte Effektivität der Knochenheilung während der Anwendung der Augmentation von Calcium-Phosphat-Material mit autogener Spongiosa. Unterschiedliche Erklärungsmodelle bestehen zu den positiven Facetten der Augmentation:

Laschke et al. [63] sehen einen Grund dafür im, mit der Spongiosa eingebrachten, Knochenmark, das gleichzeitig eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen beinhaltet und die Neubildung von kleinen Blutgefäßen stimuliert und beschleunigt. Verantwortlich sind dafür Stammzellen, Endotheliale Progenitorzellen und verschieden Wachstumsfaktoren.

Diese Gefäßneubildung spielt schon deshalb eine große Rolle, weil damit Sauerstoff und Nährstoffe zum Implantat transportiert werden und damit ein physiologisches Milieu geschaffen wird, welches das Einwachsen von Knochenzellen unterstützt [19, 69].

Ein weiterer Aspekt der Akzeleration kann in der Vergrößerung der interkonnektierenden Poren durch das zugegebene Material gesehen werden. Das Anreichern von Hydroxylapatit-Zement mit allogener Spongiosa führte bei *Voor et al.* [105] zu einer schnelleren Besiedlung des Defektes mit Lagerzellen und so zu einer zügigen Inkorporation der noch vorhandenen Spongiosareste.

Für *Brewster et al.* [10] und *Voor et al.* [104] spielten für die positiven Aspekte der Augmentation von Spongiosa weiterhin die Eigenschaften der Hydroxylapatitpartikel selbst eine Rolle. Allerdings war diese Sicht eingeschränkt auf ihren Versuchsaufbau zur Untersuchung von

mechanischem Verhalten während der Implantatkompression. Im Detail betraf dies das vermehrte Vorkommen unterschiedlicher Partikelgrößen im zugegebenen Spongiosa- und Hydroxylapatit- Kompositum. Dadurch verbesserten sich zusammen im Verbund die mechanischen Eigenschaften im Kompressionsversuch.

Zur Überbrückung langer Defektstrecken, bei Anwendung im ersatzschwachen Lager, d.h. bei mangelnder knöcherner Regenerationspotenz, empfahl *Mittelmeier* [68] die Augmentation von osteostimulativen bzw. osteokonduktiven Materialien mit autogener Spongiosa oder Knochenmark. In diesen Fällen eignen sich, seiner Meinung nach, Ersatzstoffe allein nicht.

Für unsere Versuchsreihe verwendeten wir Ostim[®] als Hydroxylapatitkeramik, welches sich in seiner Löslichkeit von den derzeit sich auf dem Markt befindenden Keramiken unterscheidet und dennoch biokompatibel ist.

2.4.3 Ostim[®]

Ostim[®] ist eine, in Russland 1995 entwickelte, vollsynthetische, feinpartikuläre, phasenreine Paste, die auf einer Suspension aus reinem Hydroxylapatit und Wasser beruht.

Bei ständiger pH-Kontrolle durch Zugabe von Kalziumoxid (CaO) wird die chemische Herstellungsreaktion mit Phosphorsäure (H_3PO_4) eingeleitet. Nach Abschluss der Herstellungsreaktion wird die Suspension durch Filtration und Verdunstung bei einem pH-Wert von 7,5 zu einer hochviskösen Paste mit einem Hydroxylapatitanteil von 35 Prozent konzentriert. Die Phasenreinheit des Hydroxylapatits wurde durch Röntgendiffraktion gesichert, zeigte Konformität mit reinem Hydroxylapatit und eine durchschnittliche Kristallgröße von 18 nm. Die nadelförmig gestalteten Hydroxylapatit- Kristalle bilden Agglomerate. Das Ca/P- Verhältnis beträgt 1,67 [48, 53, 100].

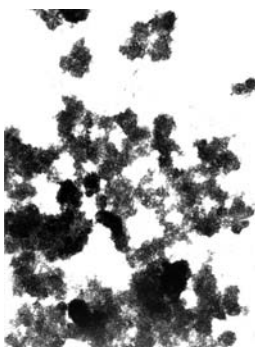


Abb. 2.3: Ostim[®]-
Kristallaggregate
(7500 x)

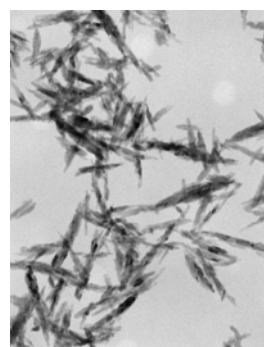


Abb. 2.2: Nadelför-
mige Ostim[®]-
Kristalle (150 000 x)

Im Vergleich zu Kalziumphosphat- Zementen härtet Ostim[®] nach Implantation oder Mischen mit Blut und/ oder Spongiosa nicht aus und führt damit nicht zu endothermen Aushärtungsreaktionen [48, 53]. Dabei zeigt es nach *Tadic* [99] eine höhere Löslichkeit als Hydroxylapa-

titkeramiken und führt nach Implantation nicht zu einer Erhöhung des Kalziumspiegels im Serum. Außerdem wird ihm von Dingeldein [24] eine hohe Pufferkapazität zugeschrieben.

Die klinische Überlegenheit eines solchen Ersatzstoffes als applizierbare Paste soll in seiner leichten Handhabung liegen, der abschließenden Formschlüssigkeit mit dem umgebenden Gewebe und der Fähigkeit, schnell resorbiert werden zu können [17].

Ostim[®] wurde bereits als Knochenersatzstoff in den chirurgischen Disziplinen Traumatologie, Orthopädie und Kieferchirurgie sowie in der Zahnheilkunde eingesetzt. Hierbei diente er zum Beispiel als Platzhalter in Kombination mit einer Plattenosteosynthese bei verschiedenen metaphysären Frakturtypen der Tibia als auch des Calcaneus [17, 24, 48]. Dabei wurden histomorphologisch weder eine Entzündungsreaktion noch eine Akkumulation von Makrophagen beobachtet. Vereinzelt wurden Osteoklasten gesichtet, deren Resorptionsfläche kleiner als 0,1 Prozent der gesamten Trabekeloberfläche betrug. Die Osteozyten waren regulär innerhalb der Knochen trabekel verteilt [48].

Ostim[®] soll am Applikationsort zu einem mit Kalzium- und Phosphationen angereicherten Milieu führen, welches die Einwanderung knochenbildender Zellen beschleunigt und die lokale Knochenheilung stimuliert. Eine dabei entstehende Fragmentation des Materials konnte bei verschiedenen Untersuchungen schon kurz nach dem Einbringen beobachtet werden [63, 91]. Diese Materialfragmentation wurde nach *Schnettler* [91] als essentieller Schritt in Richtung erfolgreiche Rekonstitution der Gewebeintegrität interpretiert. Dabei zeigte sich, dass es, ungeachtet der verwendeten Tierspezies und des Versuchsaufbaues, zu einer Infiltration von Zellen kam. Diese ist nach *Laschke* [63] als Folge einer erfolgreichen Angiogenese zu werten und resultierte bei *Schnettler* [91] in einer Knochenneubildung durch Osteoblasten im Sinne einer Osteokonduktion. Innerhalb von drei bis vier Wochen war Ostim[®] in der Lage, *critical-size-defects* am Versuchsmodell Kaninchen und nach ca. 60 Tagen bei Tibia- Kopf- Defekten am Schaf komplett auszufüllen [90, 91].

Für Ostim[®] ist der Kontakt mit dem vitalen Knochen essentiell um eine Gefäßeinsprossung und somit die Einwanderung von knochenbildenden Zellen zu gewährleisten. Tierexperimente haben dabei gezeigt, dass nanokristallines Hydroxylapatit an den Knochen bindet und die Knochenheilung durch Stimulation der Osteoblastenaktivität anregt. Im avitalen Knochenlager kann durch fehlende Gefäßeinsprossung mit Ostim[®] keine Knochenneubildung erfolgen [24, 91].

3 Material und Methoden

Alle tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten im Zentrum für Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Anfertigung der histologischen Präparate sowie deren abschließende Auswertung wurden im Labor für Experimentelle Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Der Tierversuch wurde vom Land Sachsen- Anhalt, dem Regierungspräsidium Dessau unter dem Aktenzeichen 42502/2-560 MLU Halle genehmigt.

Für den gesamten Versuchsaufbau standen 66 Kaninchen der Rasse „Weisse Neuseeländer“ zur Verfügung. Es wurden aus überwachten Zuchtbeständen (*Firma I. Krieg, Niederwünsch*) weibliche, adulte Tiere verwendet und bei Ankunft sofort mit einer laufenden Nummer am Ohr versehen um Verwechslungen der Tiere während des Versuchsablaufes zu vermeiden. Dazu benutzten wir einen wasserunlöslichen Faserschreiber. Zu Beginn der Versuchsreihe waren die Tiere zwischen sechs und neun Monaten alt. Stichprobenartige Röntgenuntersuchungen der Hinterläufe zeigten geschlossene Epiphysenfugen und belegten ein abgeschlossenes Skelettwachstum. Entsprechend der Vorgaben zur Versuchstierhaltung waren die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht und erhielten ihre Nahrung standardisiert in Form von industriell hergestelltem Pelletfutter und Wasser ad libitum. Für die Gesundheitspflege, die tägliche Raum- und Käfigreinigung sowie Klima- und Lichtrhythmus sorgte das Personal des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Eine Akkomodationszeit der Tiere an die vorherrschenden Laborbedingungen wurde eingehalten. Die Tiere wurden erst ca. 7 Tagen nach Einstallung in den Versuch einbezogen.

3.2 Versuchsanordnung

Die Versuchstiere wurden randomisiert auf fünf verschiedene Zeitgruppen zu je zwölf Tieren aufgeteilt (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Übersicht Versuchstiere

Tier	Tiernummer/ Zeitgruppe					Implantat/ rechts	Implantat/ links
	1	2	3	4	5		
1	63	54	36	52	39	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] / Allogene Spongiosa
2	64	55	58	53	49	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] / Allogene Spongiosa
3	65	56	59	61	50	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] / Allogene Spongiosa
4	66	57	60	62	51	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] / Allogene Spongiosa
5	10	22	14	19	6	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] allein
6	13	25	3	2	24	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] allein
7	47	45	18	21	23	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] allein
8	48	46	20	7	26	Ostim [®] / Autogene Spongiosa	Ostim [®] allein
9	27	28	41	30	35	Ostim [®] / Allogene Spongiosa	Ostim [®] allein
10	44	4	29	43	38	Ostim [®] / Allogene Spongiosa	Ostim [®] allein
11	5	9	33	42	40	Ostim [®] / Allogene Spongiosa	Ostim [®] allein
12	8	12	34	32	37	Ostim [®] / Allogene Spongiosa	Ostim [®] allein

Die Überlebenszeiten betragen für Gruppe 1 zwei Wochen, für Gruppe 2 vier Wochen, für Gruppe 3 sechs Wochen, für Gruppe 4 acht Wochen und Gruppe 5 zwölf Wochen. Innerhalb jeder Zeitgruppe gab es drei unterschiedliche Implantattypen. Diese setzten sich zusammen aus:

- *Ostim[®] allein*
- *Ostim[®] in Kombination mit autogener Spongiosa* und
- *Ostim[®] in Kombination mit allogener Spongiosa.*

Alle Eingriffe an den Tieren wurden vom selben Operateur vorgenommen. Die Euthanasie der Tiere wurde mit einer Überdosis Pentobarbital (*Pentobarbital- Natriumsalz, Firma Sigma-Aldrichchemie GmbH, Steinheim, Deutschland*) durchgeführt. Zur histologischen Aufarbeitung aller Präparate kam die Trenn- Schliff- Technik zur Anwendung.

3.3 Implantate

3.3.1 Autogene Spongiosa

Die Autogene Spongiosa wurde aus dem Material des Bohrlochdefektes mit einer Diamant-Hohlfräse gewonnen. Der dabei gewonnene Spongiosazylinder wurde in einer von 0,9 % Natriumchloridlösung getränkten Kompresse asserviert und erst kurz vor Anreicherung mit Ostim[®] zerkleinert. Bei einer durchschnittlichen Operationsdauer von ca. 60 min betrug die Asservationszeit weniger als 20 min und lag damit deutlich unter der von *Drenhaus* [26] formulierten Grenze zur Verwendung autogener Spongiosa. *Drenhaus* bezweifelte, dass autoge-

ne Spongiosa nach einer intraoperativen Lagerungszeit von mehr als 30 min noch ihre wesentlichen Vorteile gegenüber anderen Verfahren besitzt.

3.3.2 Allogene Spongiosa

Allogene Spongiosa wurde aus den proximalen Anteilen der Tibia von den Versuchstieren gewonnen.

Beide Tibiae wurden proximal abgesetzt. Die enthaltene Spongiosa wurde steril mit einem scharfen Löffel entnommen und nach Explantation sofort gekühlt. Das übrige Knochenmaterial wurde durch eine Knochenmühle zerkleinert und standardmäßig im hauseigenen Desinfektionssystem „Lobator SD- 2“ aufbereitet, anschließend portionsweise steril verpackt und bei -84° Celsius aufbewahrt.

Das weitere Procedere wurde in Bezugnahme auf die Richtlinien zur Führung einer Knochenbank organisiert.

3.3.3 Ostim[®]

Ostim[®] ist ein nanopartikulärer Hydroxylapatit, der uns durch die Firma *Osartis GmbH & Co.KG* zur Verfügung gestellt wurde. Wir verwendeten dazu 2 ml Applikationsspritzen 35 % igen Ostims[®] der gleichen Chargennummer, mit der 2 Tiere ausreichend getestet werden konnten. Die Beimischungen der unterschiedlichen Knochengewebe wurden unter sterilen Bedingungen während der Operation standardmäßig durchgeführt.



Abb. 3.1: Ostim[®] in handelsüblicher Applikationsform

3.4 Implantatanfertigung

Die Implantate wurden den Tieren randomisiert zugeteilt. Daraus ergab sich die Verteilung laut Tab. 3.1. Zur Defektauffüllung wurde Ostim[®] mit *autogener oder allogener Spongiosa* vermischt. Als Kontrolle wurde Ostim[®] *allein* verwendet. Die Implantatgemische wurden so hergestellt, dass ein Verhältnis von Knochenmaterial zu Ostim[®] von 1:1 bestand. Bei einer durchschnittlichen Bohrdefektlänge von 10 mm und einem Defektradius von ca. 2,0 mm ergab sich ein Volumen von ca. 126 mm^3 . Aus einer 2 ml- Fertigspritze wurden 0,5 ml Ostim[®] mit ca. 100 μg Spongiosa angereichert und pro gesetzten Defekt eingesetzt. Ostim[®] behält

dabei seine pastöse Form bei. Es entstanden so Implantatkörper mit einer Länge von ca. 1 cm und einem durchschnittlichem Durchmesser von ca. 4,0 mm. Dadurch gelang ein formschlüssiger Abschluss zwischen Bohrlochdefekt und Implantatbett.

3.5 Operativer Eingriff und Probengewinnung

3.5.1 Anästhesie

Alle Eingriffe erfolgten unter aseptischen Bedingungen in einem Tieroperatioossaal. Zur Allgemeinanästhesie erhielten alle Tiere gewichtsadaptiert Ketaminhydrochlorid (*Ursotamin*[®]) 0,2 ml/kg KM und Medetomidinhydrochlorid (*Domitor*[®]) 0,25 ml/kg KM i. m. injiziert. Allen Tieren wurde präoperativ ein i. v.-Zugang in eine laterale Ohrvene gelegt, über den während der gesamten Operationszeit eine Flüssigkeitssubstitution (*NaCl 0,9% Braun*[®]) gewährleistet war. Bei Bedarf wurde eine geringe Menge des Anästhesiemisches i. v. nachgespritzt.

3.5.2 Operatives Vorgehen

Nach Eintreten der Anästhesie erfolgte eine Rasur der gesamten Hinterläufe beider Seiten. Nach Lagerung auf einem Vakuumkissen in Rückenlage und Fixierung der Extremitäten erfolgten die ausgiebige Desinfektion des Operationsgebietes und die sterile Abdeckung. Begonnen wurde auf der linken Seite mit einer Inzision über der medialen Femurkondyle in der Frontalebene. Es folgten das Spalten und Abheben des Periostes sowie das kalkulierte Vorbohren mit Hilfe eines Kirschner-Bohrdrahtes von Ø 1,25 mm zur exakten Positionierung des Bohrlochdefektes. Anschließend wurde mit einer Hohlzylinderfräse von 4,0 mm Innendurchmesser, mit Hilfe des noch stehenden Bohrdrahtes, unter Schonung des Knochenursprungs der Kollateralbänder ein ca. 10,0 mm tiefer Knochenzylinder unter Wahrung der Gegenkortikalis gefräst und entfernt.



Abb. 3.2: Operationssitus nach Präparation des Implantatortes; Femur links



Abb. 3.3: Operationssitus mit gespültem Leerdefekt

Um Hitzenekrosen während des Bohrvorganges mit geringer Drehzahl zu vermeiden, wurde durch die Operationsassistenten physiologische Natriumchloridlösung (*NaCl 0,9% Braun*[®]) auf

die Hohlfräse geträufelt. Die so gewonnene Spongiosa wurde in einer mit physiologischer Lösung (*NaCl 0,9% Braun*[®]) getränkten Kompresse asserviert. Danach folgte das Ausspülen der Bohrhöhle. Die Bohrlöcher wurden auf beiden Seiten mit den vorausgeplanten Implantaten bestückt. Es wurde beiderseits aufmerksam auf einen Abschluss der Implantate mit den Kortikales geachtet. Das Implantatbett blieb unverschlossen.

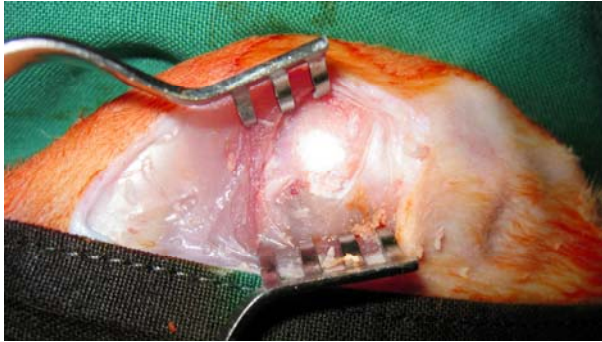


Abb. 3.4: Operations situs, Leerdefekt gefüllt mit Ostim[®] vor Wundverschluss

Danach erfolgten die Naht des Periostes sowie der schichtweise Wundverschluss. Ein steriler Verband über der verschlossenen Wunde zum Schutz der Hautnähte bildete den Abschluss des Eingriffes. Zur postoperativen Schmerztherapie erhielten die Tiere einmalig intraoperativ und über die drei darauf folgenden Tage hinweg zweimal täglich 50 mg des Wirkstoffes Tramadolhydrochlorid (*Tramal*[®] 100 mg Injektionslösung) subkutan injiziert.

3.5.3 Postoperative Kontrolle

Postoperativ wurden die Tiere auf Zellstoff gelagert und erst nach vollständigem Abklingen der Anästhesie in den Tierstall gebracht, um externe Stressfaktoren zu vermeiden. Eine klinische Wundkontrolle mit besonderer Berücksichtigung von Infektionen und Nahtinsuffizienzen wurden täglich bei allen Tieren durchgeführt.

3.5.4 Euthanasie und Explantation

Bei Erreichen der vorgesehenen Standzeit wurden die Tiere geopfert. Das Procedere wurde dabei in Anlehnung an *Fehr* [31] -gering verändert- durchgeführt. Statt einer gebrauchsfertigen Lösung verwendeten wir eine Wirkstofftrockensubstanz (*Pentobarbital-Natriumsalz, Firma Sigma-Aldrichchemie GmbH, Steinheim, Deutschland*) in physiologischer Kochsalzlösung (*NaCl 0,9 %, Braun*[®]), so dass eine Lösung von 200 mg pro ml resultierte.

Nach erfolgter Opferung wurde der Weichteilmantel beider Femora bis zu den Tuberositas Tibiae abpräpariert. Es erfolgte anschließend die systematische Entfernung des Bandapparates zwischen Femora und Tibia. Abschließend wurden die Femora suprakondylär abgesetzt. Bei der makroskopischen Beurteilung fielen vereinzelt Fadengranulome auf, die aber keine Verbindung mit dem Implantatlager zeigten.

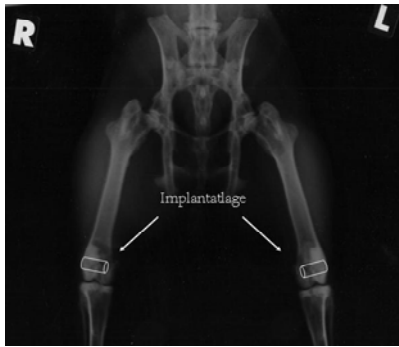


Abb. 3.5: Röntgenbildkontrolle der Implantatlage beider Hinterläufe mit Schemazeichnung

3.6 Aufarbeitung der Proben zur histologischen Untersuchung

3.6.1 Fixierung und Entwässerung

Die gewonnenen Knochenpräparate wurden gekennzeichnet und für sieben Tage in einer gepufferten 4 % -igen Formalinlösung fixiert. Danach wurden die Proben für 60 Minuten mit Leitungswasser gespült. Dies diente der Vermeidung von kristallinen Niederschlägen durch das Fixationsmedium in den fertigen Blöcken. Daran anschließend erfolgte die Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

Tab. 3.2: Entwässerung der Proben

Alkoholkonzentration	Entwässerungsdauer
70%	5 Tage
96%	3 Tage
100%	3 Tage
Histo- Clear®	2 Tage

3.6.2 Infiltration und Einbettung

Die Proben wurden zur Vorbereitung der Verarbeitung im Trenn-Dünnschliff-Verfahren in einen Kunststoff auf Methylnmethacrylatbasis, dem Technovit 9100®, eingebettet. Als Behälter wurden für die einzelnen Proben kleine Polyethylenflaschen verwendet, welche sich dafür als geeignet erwiesen. Die Einbettungslösung bestand hierbei aus Methylnmethacrylat, Dibutylphthalat und Benzoylperoxid. Das eigentliche Einbettmedium stellte das Methylnmethacrylat dar. Dibutylphthalat ist ein Weichmacher, der dem Methylnmethacrylat die gleiche Härte wie dem einzubettenden Knochen verleiht. Dadurch kam es bei den sich später anschließenden Schleifvorgängen nicht zu Brüchen oder Ablösungen an den Kontaktzonen zwischen Kunststoff und Knochengewebe. Als Katalysator für die Polymerisationsreaktion wurde Benzoylperoxid verwendet. Zuerst wurden die Proben der Infiltration zugeführt. Dazu wurden die Proben in der Lösung mit Dibutylphthalat versetztem Technovit 9100® für je 5 Tage belassen.

Tab. 3.3: Infiltration der Knochenproben

Zusammensetzung Lösung 1	Technovit 9100 [®] Weichmacher (10 ml/ 90 ml MMA 1)
Infiltrationsdauer	2 mal 5 Tage
Infiltrationsbedingungen	Raumtemperatur

Es erfolgte ein einmaliger Wechsel der Infiltrationslösung. Bei Abschluss der Infiltration wurde das Benzoylperoxid als Katalysator zugegeben. Die Aushärtung der Proben geschah in einem thermostatkontrollierten Wasserbad bei 27° Celsius, um eine vermehrte Polymerbildung zu vermeiden. Schlussendlich wurden die Proben anschließend bei 37° Celsius getempert.

Tab. 3.4: Einbettung der Proben

Zusammensetzung Lösung 2	Technovit 9100 [®] Weichmacher (10 ml/ 90 ml MMA) Benzoylperoxid (1 g auf 100 ml MMA)
Einbettungsdauer	3 Tage
Einbettungsbedingungen	27° C (Wasserbad)
Zusammensetzung Lösung 3	Technovit 9100 [®] Weichmacher (10 ml auf 90 ml MMA) Benzoylperoxid (3 g auf 100 ml MMA)
Einbettungsdauer	3 Tage
Einbettungsbedingungen	27° C (Wasserbad)

3.6.3 Herstellung von Präparatschliffen

Bevor die entstandenen Präparatblöcke geschnitten wurden, erfolgte die Überprüfung auf vollständige Aushärtung. Die Präparate wurden an einer Präzisions- Diamant- Trennschliff-einrichtung (*Fa. Exakta Apparatebau, Norderstedt, Deutschland*) hergestellt. Bis zum Erreichen der äußeren Kortikalis wurde schrittweise gesägt um das überschüssige Methylmethacrylat zu entfernen. Anschließend wurden je Block vier Schriffe von 900 µm Dicke senkrecht zur Längsachse des Bohrlochdefektes gewonnen. Die Trennschleifeinrichtung setzt sich zusammen aus Trenneinheit, Präzisionsparallelführung, dosierbarem Vorschub und einem Kühlsystem. Das Prinzip basiert auf einer Bandsäge. Zum Gewinn glatter und sauberer Schnittflächen pendelte die Werkstückführung um ihre eigene Achse. Der Präparatevorschub wird über das *contact-point-Verfahren* mit verschiedenen, zur Verfügung stehenden Gewichten gesteuert, um eine optimale Einstellung für das zu untersuchende Material zu finden. Damit lässt sich ein Ausbrechen von Knochenbälkchen an der Kunststoff/ Knochengrenze verhindern.

3.6.4 Dünnschlifftechnik

Nun folgte zur Herstellung von histologischen Präparaten das Aufkleben auf einen transparenten, planparallelen Objektträger. Die Aushärtung des transparenten Klebers (*Technovit 7210[®]*, Fa. Kulzer, Friedrichshafen, Deutschland) wurde unter UV- Licht vorgenommen. Den Feinschliff auf durchschnittlich 80 µm und das Polieren des aufgeklebten Präparates besorgte ein rotierendes Mikroschleifsystem (Fa. Struers, Willach, Deutschland). Dafür wurde Nassschleifpapier in aufsteigender Körnung (P 800, P 1200, P2400, P 4000) verwendet.



Abb. 3.6: Probe eingebettet in MMA mit 4 Knochen-schliffen



Abb. 3.7: Fertige Knochen-schliffe aufgeklebt und ungefärbt

3.7 Histologische Färbungen

3.7.1 Ladewig- Färbung

Zur histomorphometrischen Auswertung wählten wir als Oberflächenfärbung die Ladewig-Färbung. Nach *Ladewig* [62] eignet sich diese Methode zur gleichmäßigen und niederschlagsfreien Färbung der Präparate bei konstanten Resultaten und feinen Kontrasten. Für unsere Untersuchungen, unter Aspekten der Histomorphometrie, konnten wir die vielseitigen Gewebedifferenzierungen optimal nutzen um *Ostim[®]* von den restlichen Geweben zu identifizieren und dessen Oberflächenanteil exakt bestimmen zu können. Durchgeführt wurde die Färbung gemäß folgenden Schritten:

- Knochenschliffe 2 min in Ameisensäure 0,1 % anätzen
- in Leitungswasser spülen
- für 2 h in Methanol 20 %
- in Leitungswasser spülen
- 10 min färben mit WEIGERTSCHEM Eisenhämatoxylin
- spülen in Aqua dest.
- 10 min färben in Phosphor- Wolframsäure 5 %
- spülen in Aqua dest.
- 12 min färben in Anilinblau-Säurefuchsin-Goldorange- Lösung
- spülen in Aqua dest.
- Entwässerung für je 1 min nacheinander mit 96 %, absolut. Ethanol
- 3 min Xylol
- Eindecken in Kanadabalsam.

Die Färbeverhalten teilen sich wie nachfolgend angegeben mit (Tab. 3.5):

Tab. 3.5: Färbeverhalten der zellulären und extrazellulären Strukturen bei der Ladewig-Färbung

Gewebestruktur	Zellkern	Bindegewebe	Erythrozyten	Kristalliner Kalk	Kalk
Färbeverhalten					Amorph
Ladewig	Dunkelbraun	Blauviolett/Karminrot	Hellorange	Grau bis Rot	Rot

3.7.2 Giemsa-Färbung

Zur histologisch, qualitativen Beurteilung des Einheilverhaltens von Ostim nutzen wir die Oberflächenfärbung nach *Giemsa* [80]. Aufgrund der guten Kontrastgebung zwischen Zellen, Interzellulärsubstanz und Hartgewebe konnten wir zelluläre Reaktionen sichtbar machen und so das histologische Bild der Auswertung abrunden.

Das jeweilige Färbeverhalten der Gewebe und deren Zellen wird aus Tab. 3.6 ersichtlich.

Tab. 3.6: Färbeverhalten der zellulären und extrazellulären Strukturen bei der Giemsa-Färbung

Gewebestruktur	Osteoblasten	Osteoklasten	Osteoid/ Bindegewebe	Alter Knochen	Neugebildeter Knochen
Färbeverhalten					
Giemsa	Blau	Blau	Blassblau	Zartrosa	Rosa

Angefertigt wurde die Färbung in der Reihenfolge der angeführten Schritte:

- Knochenschliffe 2 min in Ameisensäure 0,1 % anätzen
- in Leitungswasser spülen
- für 2 h in Methanol 20 %
- in Leitungswasser spülen
- 30 min färben in Giemsalösung 1:10 bei 60 °C im Brutschrank
- Spülen in Aqua dest.
- Spülen in Essigwasser (8 Tropfen Eisessig auf 100 ml Aqua dest.) bis der blaue Farbüberschuss verschwindet und die Schliffe rötlich erscheinen
- Entwässerung nacheinander mit 70 %, 96 %, absolut. Ethanol
- Kurz durch Xylol schwenken
- Eindecken in Kanadabalsam

3.7.3 Masson-Trichrom-Goldner-Färbung

Durch die Trichromfärbung nach *Goldner* lassen sich unverkalkte Knochenmatrix und Weichteilgewebe gut voneinander unterscheiden. Ursprünglich zur Histomorphometrie geplant, konnten wir diese Färbung zur quantitativen Auswertung nicht nutzen, da sich unser Implantatwerkstoff aufgrund seines Hydroxylapatitgehaltes mit anfärbte. Eine Differenzierung von Lagerknochen und Implantat war somit nur bedingt möglich. Bei der histologisch, qualitati-

ven Auswertung konnten wir die mit dieser Färbemethode bearbeiteten Präparate jedoch nutzen. Das Färbeverhalten der unterschiedlichen Gewebe ist in Tab. 3.7 zusammengefasst.

Tab. 3.7: Zelluläres und extrazelluläres Färbeverhalten bei der Masson-Trichrom-Goldner-Färbung

Gewebestruktur	Zytoplasma	Erythrozyten	Osteoid/ Bindegewebe	Mineralisierter Knochen	Verkalkte Knorpelmatrix
Färbeverhalten Masson-Trichrom-Goldner	Rötlich- Braun	Orange	Rotorange	Grün	Hellgrün

Die Färbung wurde gering modifiziert nach dem Schema von *Romeis* [80] durchgeführt:

- Knochenschliffe für 2 min in Ameisensäure 0,1% anätzen
- mit Leitungswasser spülen
- für 2 h in Methanol 20 %
- mit Leitungswasser spülen
- 7 min färben in Säurefuchsin-Ponceau (Masson Lösung, Goldner I)
- spülen mit Essigsäure 2 %
- 5 min färben mit Phosphorwolframsäure-Orange-G
- spülen mit Essigsäure 2 %
- 10 min färben in Lichtgrün bei 60°C im Brutschrank
- spülen in Essigsäure 2 %
- Auswaschen mit Aqua dest.
- Nacheinander Entwässern mit 70%, 96%, absolut. Ethanol
- Kurzes Schwenken in Xylol
- Eindecken in Kanadabalsam.

3.8 Auswertung

Die Auswertung der Knochenschnitte erfolgte morphologisch und morphometrisch. Die Knochenneubildungsrate wurde histomorphometrisch unter Verwendung der Relation von Knochenfläche zur gesamten Defektfläche evaluiert. Qualitativ wurde das Einwachsverhalten anhand der *Giemsa*- Färbung dokumentiert.

3.8.1 Histomorphometrie

Zur Histomorphometrie wurde das automatische Bildanalysesystem KS 300 (*Fa. Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland*) benutzt. Dazu wurde das histologische Bild mit einer Videokamera am Lichtmikroskop Axioplan (*Fa. Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland*) digitalisiert.

Es war mit dieser Gerätekonstellation möglich, Echtfarbbilder im RGB oder HLS- Modus zu akquirieren und zu analysieren. Wir entschieden uns für den HLS- Modus, da mit diesem eine gute Differenzierung von farbttemperaturähnlichen Rottönen möglich ist und das digitalisierte

Bild in guter Übereinstimmung zum lichtmikroskopischen Bild stand. Das Farbbild wird dabei in drei Grauwertbilder zu jeweils 24 Bit Bildtiefe zerlegt. Für die genaue Beurteilung der histologischen Strukturen wurde eine 100-fache Vergrößerung gewählt. Durch die durchschnittliche Größe des Bohrlochdefektes von ca. 4 mm kam nicht das gesamte Implantatbett in einem Gesichtsfeld zur Darstellung. Es wurden deshalb 80 Bilder digital so aneinandergefügt, dass es ein vollständiges Übersichtsbild entstand. Möglich wurde dies durch einen Scanningtisch (*Fa. Merzhäuser, Wetzlar, Deutschland*). Dieser konnte über ein Softwaretool des Systems KS 300 direkt gesteuert werden. Dazu wurde eine Meßsoftware als Makro programmiert. Die Tischsteuerung wurde so gewählt, dass der Bereich des Bohrlochdefektes im Zentrum lag und alle relevanten, sich darum gruppierenden Strukturen, erfasst werden konnten. Die Bildgröße betrug 2984 x 2800 Pixel. Die Analyse der Strukturen erfolgte in mehreren Schritten, welche jeweils zur interaktiven Kontrolle durch ein graphisches Overlay angezeigt wurden.

Folgendes Procedere war dabei festgelegt:

- Festlegung der Lage der Messregion („region of interest“)
- Markieren des Osteoides und der mineralisierten Spongiosa
- Erstellen des binären Bildes und Messung.

Durch die ständige graphische Darstellung bestand eine interaktive Kontrolle für die Lage der Messregion und Markierungen. Dies betraf insbesondere die Farbschwankungen und überlagerungsbedingte Artefakte. Es konnte somit auch sichergestellt werden, dass alle relevanten Strukturen berücksichtigt wurden. Die aus der Segmentierung entstandenen Binärbilder konnten bei vorhandenen Segmentierungsfehlern durch binäre Operationen an Hand der Software korrigiert werden. Für alle Präparate wurde das gleiche Makro verwendet, so dass der Messprozess für alle Präparate gleich war. Die „region of interest“ (*ROI*) wurde für alle Präparate mit 950 Pixel gleich groß gewählt und im digitalisierten Bild auf den Bohrlochdefekt zentriert festgelegt. Alle anderen, über diesen Messkreis hinaus verteilten, Strukturen wurden ausgeblendet. Die Messung gliederte sich in folgende Schritte:

- Segmentieren des mineralisierten Knochens
- Überführen der segmentierten Region in ein binäres Bild
- Messung der Pixelanzahl des Binärbildes
- Berechnen des Verhältnisses mineralisierter Knochen/ Gesamtfläche
- Messung der Trabekeldicke
- Speicherung der Messdaten in einer Datenbank.

Jeder gefärbte Knochenschliff wurde dreimal zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Folgenden Strukturparameter zur Bestimmung von Knochenneubildung und Knochenqualität wurden in Anlehnung an *Parfitt* [77] gleichzeitig gemessen bzw. berechnet:

- **Der Anteil der mineralisierten Knochensubstanz innerhalb des Messfeldes (BV/TV) in Prozent**

Dieser Anteil ergibt sich aus dem Verhältnis der Knochenfläche zur Gesamtfläche des Messfeldes (ROI) abzüglich der Implantatfläche.

- **Die durchschnittliche Trabekeldicke ($Tb.Th$) in μm**

Dazu wurde in einer Richtung, für alle Messungen gleich, die Trabekeldicke während des Messvorganges als Teilschritt des Makros über die gesamte Messfläche hinweg bestimmt und gemittelt.

- **Die Anzahl der Trabekel ($Tb.N$) pro mm**

Dieser Parameter wurde errechnet nach der Formel:

$$\frac{(BV/TV)}{Tb.Th}.$$

- **Der Trabekelzwischenraum ($Tb.Sp.$) in μm**

Der Trabekelzwischenraum wird nach folgender Formel berechnet:

$$\left(\frac{1}{Tb.N}\right) - Tb.Th.$$

3.8.2 Statistik

Die Statistische Aufarbeitung sowie die Anfertigung der Diagramme erfolgten mit dem Datenverarbeitungsprogramm SPSS für Windows 12.0 (*SPSS Deutschland GmbH, München*). Es wurden bei der Auswertung die unterschiedlichen Implantatgruppen untereinander zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten überprüft. Da die Knochenschliffe mehrfach gemessen wurden, gingen ihre Messwerte gemittelt in die statistische Auswertung ein. Zur Anwendung kamen für den Vergleich der Mittelwerte der Mann-Whitney U-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Bedingungen für den Mann-Whitney U-Test sind nach *Sachs* [88] die Unabhängigkeit der Stichproben voneinander und eine nicht-normalverteilte Grundgesamtheit. Durch unser Studiendesign wurden beide Kriterien erfüllt. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs konnten nur generelle Tendenzen zwischen den Implantatgruppen zu gleichen Untersuchungszeitpunkten bestimmt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Histologische Befunde

4.1.1 Zwei Wochen postoperativ

Ostim[®] allein

Zwei Wochen nach Implantation der Hydroxylapatitkeramik bildet sich vom randständigen Wirtsknochen ausgehend zarter Geflechtknochen, der das Implantat und die Kavität ringförmig umschließt und an der Oberfläche von Osteoid überzogen ist. Nur an wenigen Stellen hat dieser neu gebildete Knochen unmittelbar bindegewebsfreien Kontakt zur Implantatoberfläche (Abb. 4.1).

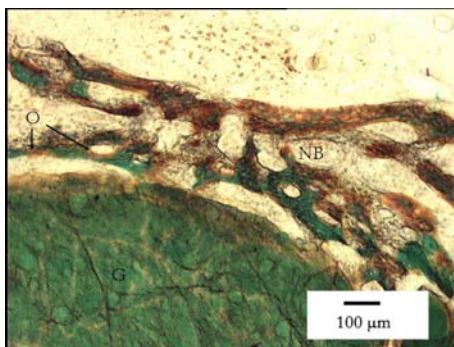


Abb. 4.1: Ostim[®] und umgebender Geflechtknochen, Masson-Trichrom-Goldner-Färbung

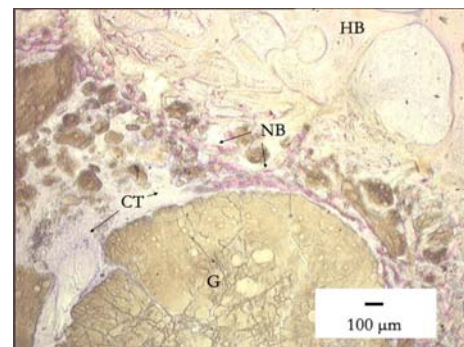


Abb. 4.2: Implantatlage in Umgebung des Lagerknochens, Giemsa-Färbung

Das Implantatmaterial baut sich diskontinuierlich und bruchstückhaft an den Rändern ab. Brocken unterschiedlicher Größe haben sich vom zentralen Kern gelöst und werden zum überwiegenden Teil von lockerem, zellarmem Bindegewebe umgeben. An einigen Stellen wächst der Geflechtknochen in die Hohlräume zwischen den einzelnen Implantatkonglomeraten ein und hat kleinere Fragmente der Keramik ummantelt. Im Zentrum behält es eine kompakte Form und zeigt keinerlei Zerfallserscheinungen (Abb. 4.2). Das Bindegewebe enthält mononukleäre Zellen, vor allem Plasmazellen und Lymphozyten. Ganz vereinzelt sind mehrkernige Riesenzellen zu erkennen. Sie liegen jedoch ebenfalls im Bindegewebe und nicht auf der Oberfläche des Implantates.

Ostim[®] in Kombination mit autogener Spongiosa

Im Gegensatz zum Ostim[®] allein ist bei der Kombination mit autogener Spongiosa bei den meisten Versuchstieren ein komplett scholliger Zerfall des Ostims[®] zu beobachten. Es zerfällt in kleine und kleinste Partikel, die von der beigemischten Spongiosa separiert sind. An den Rändern des Wirtsknochens hat sich ein schmaler Saum von jungem Geflechtknochen mit zahlreichen kleinen Trabekeln gebildet (Abb. 4.3).

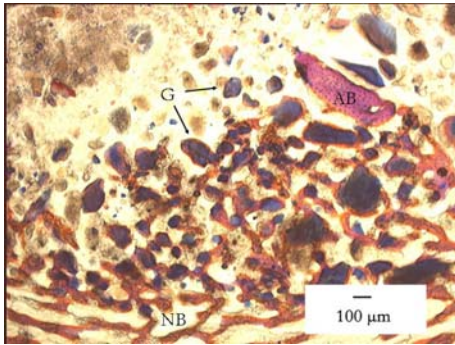


Abb. 4.3: Zerfallenes Implantat mit Geflechtknochen und autogenem Knochen, Ladewig-Färbung

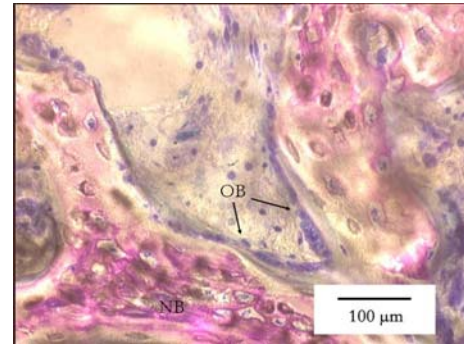


Abb. 4.4: Knochentrabekel mit osteoblastärem Saum, Giemsa-Färbung

Diese sind von Osteoblasten bedeckt und grenzen fast ausschließlich an eine dicke Bindegewebsmembran (Abb. 4.4). Die transplantierte, in Bindegewebe eingeschlossene Spongiosa zeigt sich durchweg avital und an ihrer Oberfläche Howship-Resorptionslakunen mit Osteoklasten (Abb. 4.5).

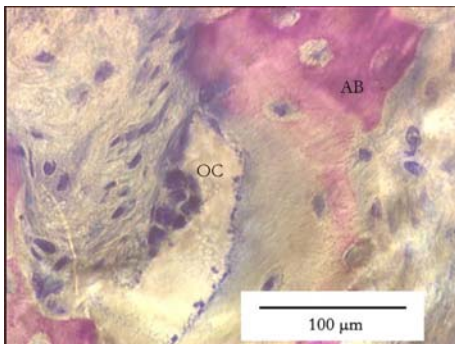


Abb. 4.5: Autogenes Knochengewebe mit Osteoklasten, Giemsa-Färbung

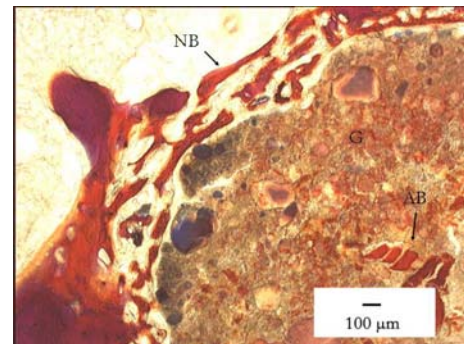


Abb. 4.6: Geflechtknochensaum und autogenes Knochengewebe im Implantat, Ladewig-Färbung

Im Bindegewebe selbst finden sich zahlreiche Makrophagen mit einem schaumigen Zytoplasma, die Hydroxylapatitpartikel phagozytiert haben. Darüber hinaus sind Lymphozyten, Plasmazellen und Fibrozyten zu erkennen. Mehrkernige Riesenzellen sind nur sehr vereinzelt zu finden. Bei einer zweiten Gruppe von Tieren liegt das Implantatmaterial, wie beim Ostim[®] allein, kompakt in der Implantationshöhle und zeigt nur an den Rändern kleinere, abgesprengte Fragmente. Es ist an der Grenze zum Wirtsknochen von feinen Bälkchen aus jungem Geflechtknochen umgeben. Auch hier ist das Implantat fast durchgängig von Bindegewebe abgegrenzt, das zum Teil ausgeprägter als beim Ostim[®] allein erscheint (Abb. 4.6).

Ostim[®] in Kombination mit allogener Spongiosa

Das eingebrachte Implantat hat sich an den Rändern aufgelöst, ist kleinschollig zerfallen und vollständig von einer schmalen Membran aus zellreichem Bindegewebe eingeschlossen. Vom

umgebenden Wirtsknochen ausgehend haben sich bei einigen Versuchstieren zahlreiche und stark verzweigte Trabekel aus Geflechtknochen gebildet, die das Implantat unvollständig einschließen (Abb. 4.7).

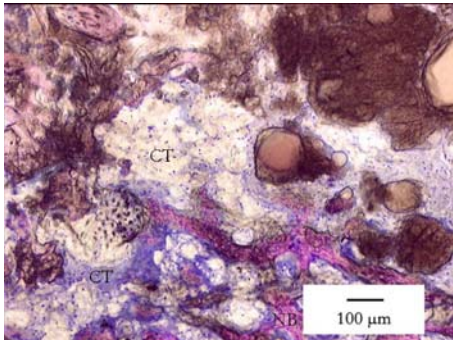


Abb. 4.7: Bindegewebe zwischen Implantat und Lagerknochen, Giemsa-Färbung

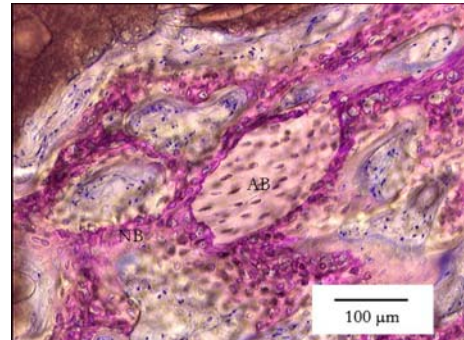


Abb. 4.8: Eingeschlossenes allogenenes Knochengewebe, Giemsa-Färbung

Der eingebrachte allogene Knochen ist avital. Zum Teil liegt er noch im Ostim[®] eingeschlossen, zum Teil an seiner Oberfläche und wird an einigen Stellen bereits vom Wirtsknochen umspannt (Abb. 4.8). Bei anderen Tieren dieser Gruppe kommt es zu keiner Osteoneogenese am Rand des Wirtsknochens. Vielmehr liegt das Implantat ebenfalls an den Rändern schollig zerfallen im vollkommen areaktiven Gewebe und trägt im Inneren die von dem Hydroxylapatit eingeschlossenen allogenenen Knochentransplantate (Abb. 4.9).

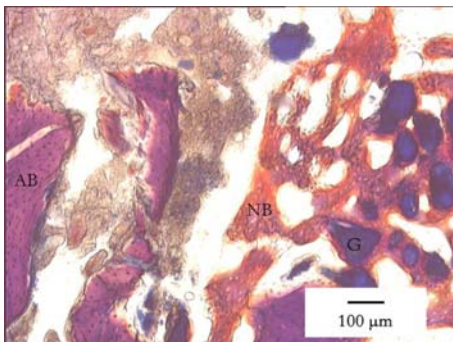


Abb. 4.9: Ostim[®] eingeschlossen von Geflechtknochen, Ladewig-Färbung

4.1.2 Vier Wochen postoperativ

Ostim[®] allein

Vier Wochen nach Implantation von Ostim[®] allein findet sich eine relativ kompakte Masse im Zentrum des Bohrloches, die jetzt eine durchgehend konglomeratartige Struktur mit einem grobscholligen Randsaum zeigt. Die Reaktionen des Lagerknochens auf das Implantat sind unterschiedlich. Bei einem Teil der Versuchstiere ist eine intensive, vom Lagerkochen ausgehende Neubildung von feinen Knochen trabekeln zu beobachten. (Abb. 4.10).

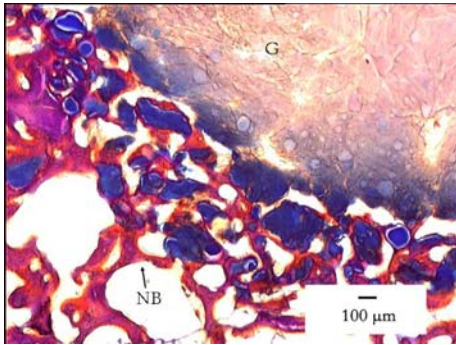


Abb. 4.10: Randständige intensive Knochenneubildung, Ladewig-Färbung

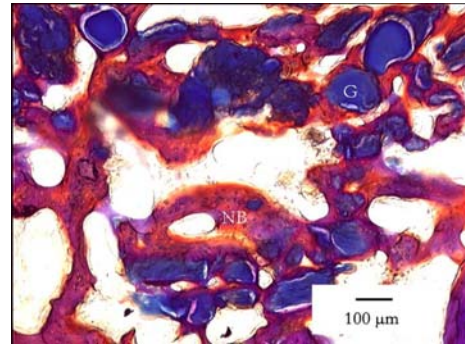


Abb. 4.11: Von Geflechtknochen eingeschlossenes Ostium[®], Ladewig-Färbung

Die Geflechtknochen trabekel stellen sich dabei breiter dar als nach zwei Wochen und weisen eine dichte Verzweigung auf. Neben unmittelbarem Kontakt zum Implantat lässt sich auch ein zellarmes Bindegewebe im Interface ausmachen (Abb. 4.11). Im Gegensatz dazu liegt bei anderen Tieren das Implantat fast unverändert im Bohrkanal und es finden sich nur geringfügig knöcherne Reaktionen (Abb. 4.12).

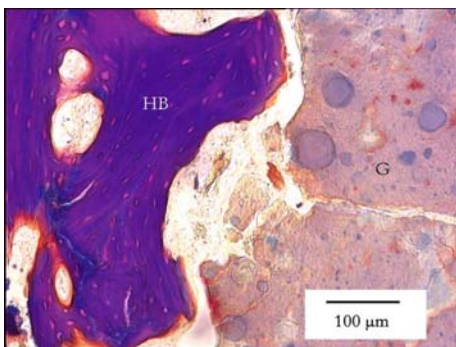


Abb. 4.12: Ostium[®] und Lagerknochen, Ladewig-Färbung

Ostium[®] in Kombination mit autogener Spongiosa

Der Ostium[®]- Anteil des Implantates liegt als kompakte Ansammlung im Knochendefekt und bietet ein ähnliches Bild wie nach 2 Wochen.

Bei sieben von acht Tieren zeigt sich lediglich an der freien Oberfläche des Implantates eine Knochenneubildung (Abb. 4.13).

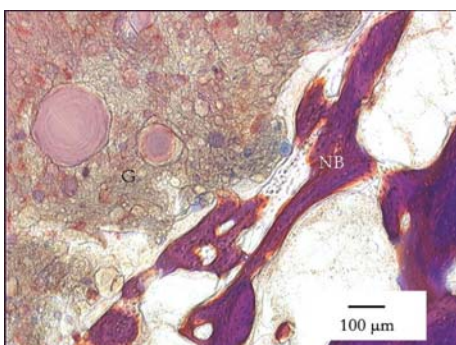


Abb. 4.13: Implantat mit oberflächlicher Knochenneubildung, Ladewig-Färbung

Dabei findet sich zum großen Teil lockeres, zellarmes Bindegewebe zwischen Implantatoberfläche und den schmalen, neu gebildeten Knochen trabekeln. Das eingebrachte Knochenmaterial unterliegt keinerlei Umbaureaktionen und liegt unverändert in der Hydroxylapatitpaste (Abb. 4.14).

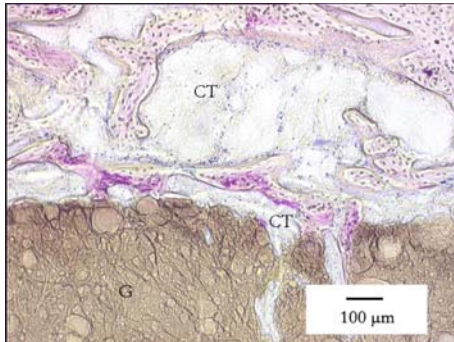


Abb. 4.14: Implantatoberfläche mit umgebendem Bindegewebe, Giemsa-Färbung

Ein großflächiger, bruchstückhafter Zerfall des Implantates als Ergebnis einer sehr aktiven Knochenbildung kann nur bei einem Versuchstier beobachtet werden. Dabei sind kleinere Hydroxylapatitfragmente entstanden, die von einer Vielzahl kleiner Bälkchen aus Geflechtknochen umspannt sind und an deren Oberfläche sich gleichzeitig eine intensive Osteoidbildung erkennen lässt (Abb. 4.15).

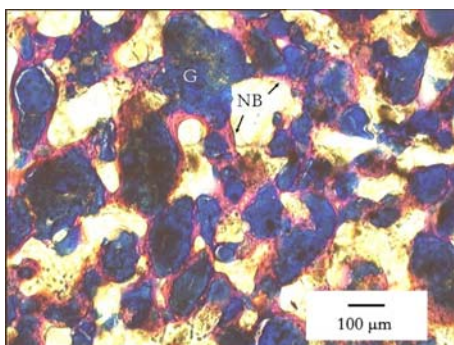


Abb. 4.15: Eingeschlossene Hydroxylapatitfragmente, Ladewig-Färbung

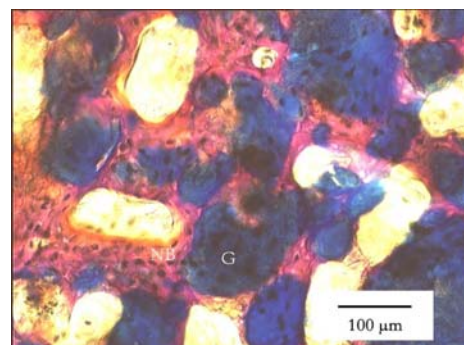


Abb. 4.16: Bindegewebsfreie Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen, Ladewig-Färbung

Es entsteht an vielen Stellen ein unmittelbarer und bindegewebsfreier Kontakt zwischen Knochenbälkchen und Implantatoberfläche (Abb. 4.16). Die neu gebildeten Knochenbälkchen tragen zusätzlich breite Osteoblastensäume und an wenigen Stellen findet sich hier zellarmes, lockeres Bindegewebe (Abb. 4.17).

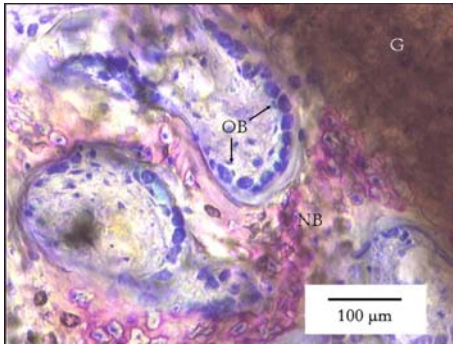


Abb. 4.17: Osteoblastensäume am Knochen-trabekel, Giemsa-Färbung

Ostim[®] in Kombination mit allogener Spongiosa

Vier Wochen nach der Implantation von Ostim[®] im Gemisch mit allogener Spongiosa ist bei vier von acht Tieren eine kräftige, trabekuläre Knochenneubildung zu erkennen. Das Ostim[®] ist teils resorbiert, teils kleinschollig zerfallen und von neu gebildetem Knochen ummantelt. Der Knochen liegt dem Implantatmaterial unmittelbar ohne bindegewebige Interponate auf (Abb. 4.18).

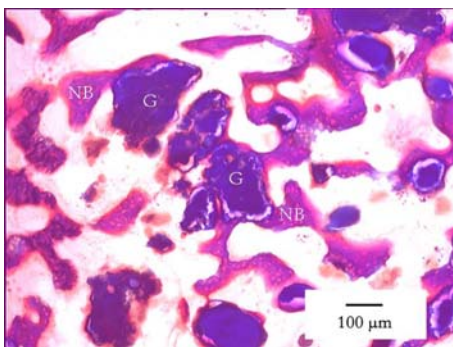


Abb. 4.18: Bindegewebstreier Kontakt zwischen Implantat und Geflechtknochen, Ladewig-Färbung

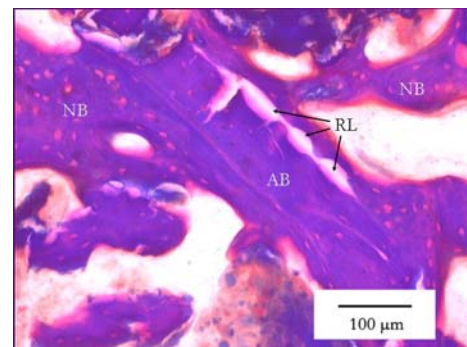


Abb. 4.19: Resorptionslakunen am allogenen Knochen, Ladewig-Färbung

Die zusätzlich eingebrachte Spongiosa findet sich an einigen Stellen in den Wirtsknochen integriert und an den Oberflächen sind Resorptionslakunen erkennbar (Abb. 4.19). Mit Hilfe der *Giemsa-Färbung* (Abb. 4.20) zeigen sich in den weiten Markräumen des neu gebildeten Knochens lockeres Bindegewebe und physiologisches, blutbildendes Mark.

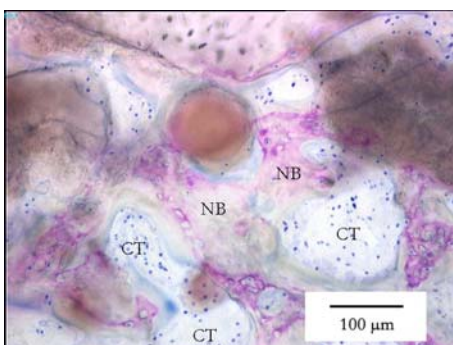


Abb. 4.20: Bindegewebe mit blutbildendem Mark, Giemsa-Färbung

Bei den übrigen vier der acht Tiere erfolgt eine knöcherne Integration dagegen nur am Rand. In der Mitte des Bohrloches liegt dabei wiederum als kompakte Masse das Ostim[®] mit eingeschlossenen allogenen Knochenanteilen ohne sichtbare Zeichen einer relevanten Knochenneubildung oder Degradation. Randständig präsentiert sich ein scholliger Zerfall des Ostim[®], dessen Fragmente von Geflechtknochen eingeschlossen sind (Abb. 4.21).

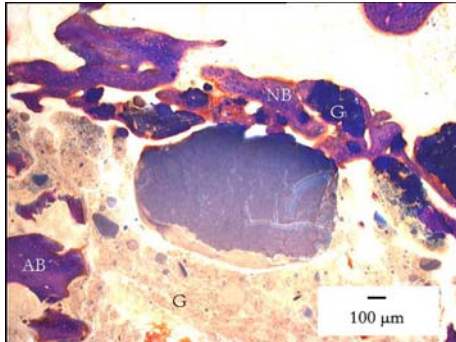


Abb. 4.21: Randständig eingeschlossenes Implantat, Ladewig-Färbung

4.1.3 Sechs Wochen postoperativ

Ostim[®] allein

Bei sechs Tieren liegt das Ostim[®] als kompaktes Konglomerat im Zentrum des Bohrkanals. Es zeigt die typische, grobschollige Morphologie, die auch zu den früheren Implantationszeitpunkten beobachtet wurde. In der Peripherie ist das Implantat aufgelockert und schmale Knochenbälkchen wachsen mit unterschiedlicher Intensität in die oberflächlichen Schichten ein (Abb. 4.22).

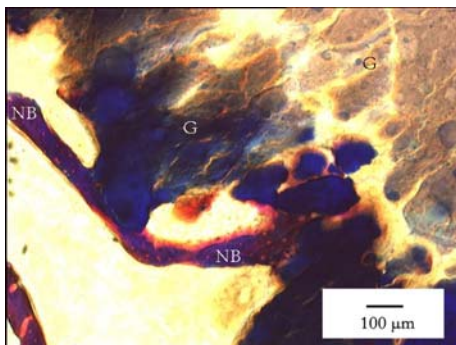


Abb. 4.22: Ostim mit einzelnen Knochen-trabekeln, Ladewig-Färbung

In der *Giemsa-Färbung* stellt sich an vielen Stellen im Interface zwischen Lagerknochen und Implantat Bindegewebe dar. Zwischen den von Geflechtknochen bedeckten Implantatfragmenten lassen sich Fibrozyten und vereinzelt Rundzellen ohne Fremdkörperriesenzellen erkennen (Abb. 4.23 und Abb. 4.24).

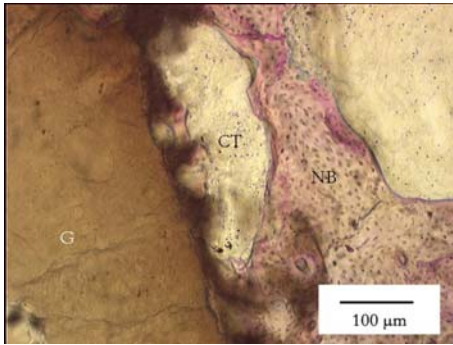


Abb. 4.23: Bindegewebe zwischen Implantat und Geflechtknochen, Giemsa-Färbung

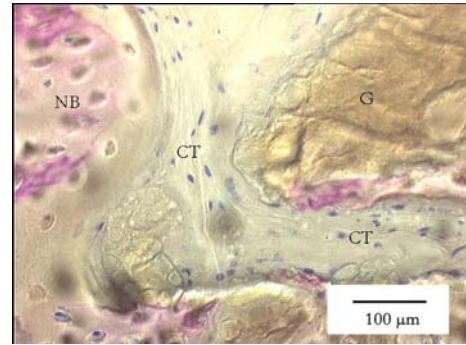


Abb. 4.24: Interponiertes Bindegewebe mit Fibrozyten, Giemsa-Färbung

Bei einem Tier findet sich im Gegensatz zu den Übrigen das Ostim[®] eher kleinschollig zerfallen. Zusammenhängende Ostim[®]- Areale bestehen nur noch im Zentrum des Implantates. Die einzelnen Implantatfragmente sind dabei zum Teil vollständig von Geflechtknochen trabekeln umschlossen (Abb. 4.25).

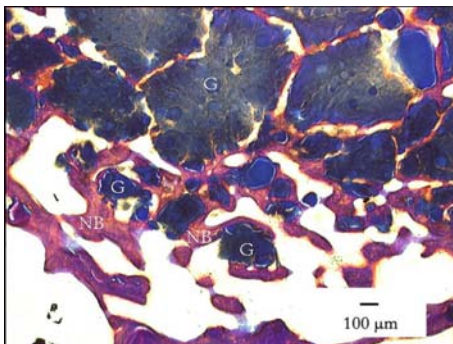


Abb. 4.25: Von Geflechtknochen umschlossenes Ostim[®], Ladewig-Färbung

Ostim[®] in Kombination mit autogener Spongiosa

Bei sechs von acht Tieren ist das Implantat vollkommen in kleine Bruchstücke zerfallen. Gleichzeitig kam es zu einer kräftigen Neubildung von Geflechtknochen, der die Implantatfragmente mit seinen Trabekeln vollständig umspannte. Die transplantierte, autogene Spongiosa zeigt im histologischen Bild eine geringe Metachromasie und wird ebenfalls von neu gebildetem Geflechtknochen eingeschlossen (Abb. 4.26).

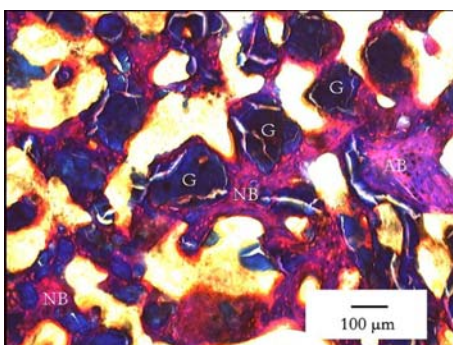


Abb. 4.26: Umschlossenes metachromatisches autogenes Knochengewebe, Ladewig-Färbung

Die *Giemsa-Färbung* zeigt einen neu gebildeten Knochen, der sich zwischen autogenem Transplantat und Ostim[®] brückenartig ausgebildet hat. Am Unterrand des autogenen Transplantates finden sich Osteoklasten in kleinen Resorptionslakunen. Im lockeren Bindegewebe lassen sich vereinzelt Plasmazellen und Lymphozyten erkennen (Abb. 4.27).

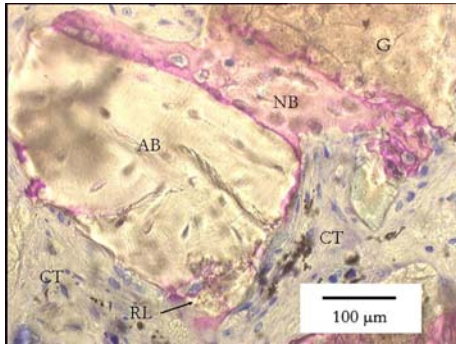


Abb. 4.27: Geflechtknochen zwischen autogenem Knochen und Ostim[®], Giemsa-Färbung

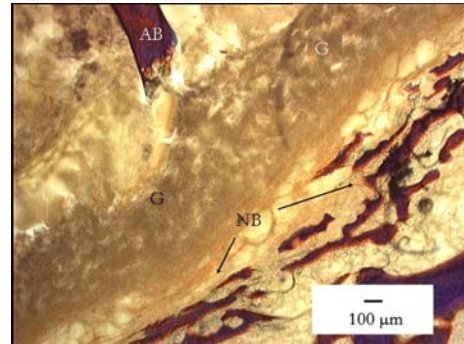


Abb. 4.28: Oberflächlicher Geflechtknochen, Ladewig-Färbung

Bei zwei von acht Tieren lag das Ostim[®] gemeinsam mit der autogenen Spongiosa weitgehend unverändert als kompaktes Implantat im Zentrum der Metaphyse und war lediglich von dünnen Knochen trabekeln umgeben (Abb. 4.28).

Ostim[®] in Kombination mit allogener Spongiosa

Bei fünf von acht Tieren liegt das Implantat mit der allogenen Spongiosa weitgehend unverändert im Bohrkanal und wird von einer Schicht straffen Bindegewebes umschlossen. Zum Wirtsknochen hin wird es von schmalen Geflechtknochen trabekeln abgegrenzt (Abb. 4.29).

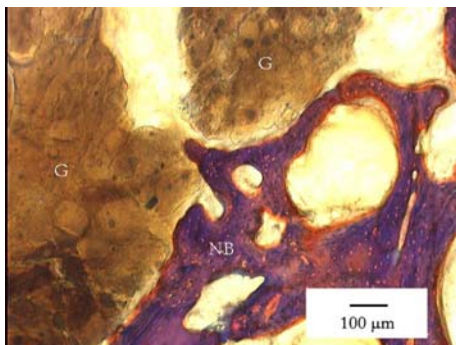


Abb. 4.29: Ostim[®] mit Geflechtknochen, Ladewig-Färbung

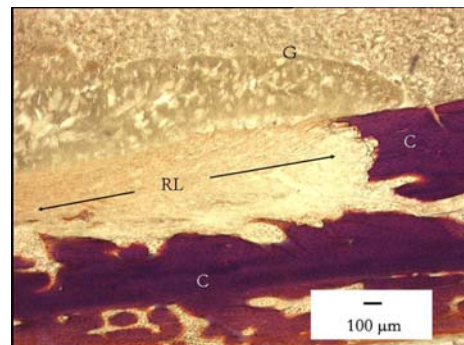


Abb. 4.30: Resorptionslakune in der Diaphyse, Ladewig-Färbung

Bei zahlreichen Tieren finden sich im kompakten Knochen der distalen Femurdiaphyse, ausgehend von der endostealen Oberfläche, große Resorptionszonen (Abb. 4.30). Die osteoklastären Resorptionszonen finden sich häufig auch im Inneren der Kortikalis. Bei einem

Tier überzieht ein lang gestreckter Kallus die Kompakta der gesamten proximalen Diaphyse (Abb. 4.31).

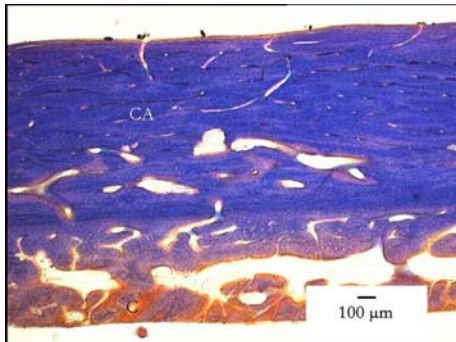


Abb. 4.31: Aufgelagertes Kallusgewebe, Ladewig-Färbung

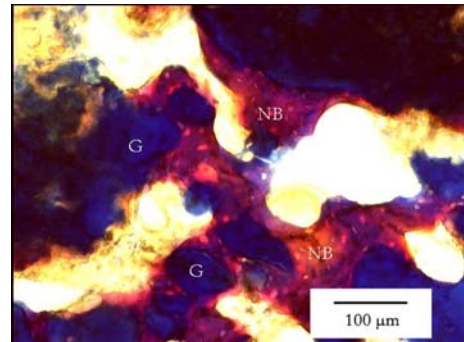


Abb. 4.32: Randständig eingeschlossenes Ostim®, Ladewig-Färbung

Bei den übrigen drei Tieren wird ein völlig anderes histologisches Bild erkennbar: Hier ist das Ostim® in großen Teilen des Implantatdurchmessers kleinschollig zerfallen. Die Implantatfragmente werden dabei vollkommen von neu gebildetem Knochengewebe umschlossen (Abb. 4.32).

4.1.4 Acht Wochen postoperativ

Ostim® allein

Acht Wochen nach der Implantation von Ostim ist bei sieben von acht Tieren keine weitgreifende Veränderung des Implantatmaterials in der distalen Femurmetaphyse zu erkennen. Das Implantat zeigt einen partiell, scholligen Zerfall und wird von einem schmalen Saum straffen Bindegewebes umschlossen. Vom randständigen Wirtsknochen ausgehend, umschließen Geflechtknochen trabekel ohne lamelläre Strukturen zirkulär das Implantat. (Abb. 4.33).

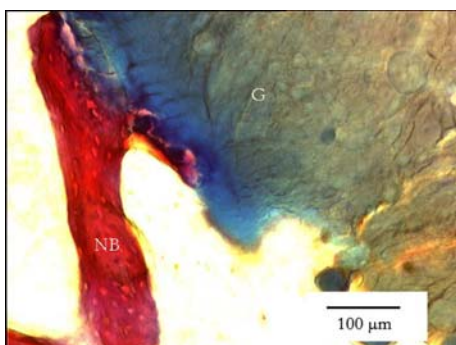


Abb. 4.33: An das Implantat angrenzender Knochen trabekel, Ladewig-Färbung

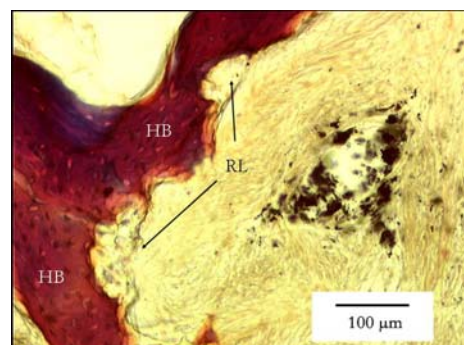


Abb. 4.34: Resorptionslakunen am Wirtsknochen, Ladewig-Färbung

An den Rändern des Implantates haben sich Teile vom Implantatkörper gelöst und liegen im Maschenwerk des Wirtsknochens, der zum Teil sehr ausgeprägte, osteolytische Arrosionen im

Sinne von typischen Howship-Resorptionslakunen bietet (Abb. 4.34). Gleichfalls können wieder Resorptionsareale in der Diaphyse der Femura mit Auflagerung von endostealen und periostealem Kallus beobachtet werden (Abb. 4.35).

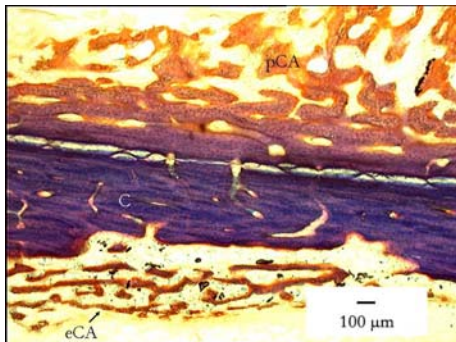


Abb. 4.35: Kallusauflagerungen an der Diaphyse, Ladewig-Färbung

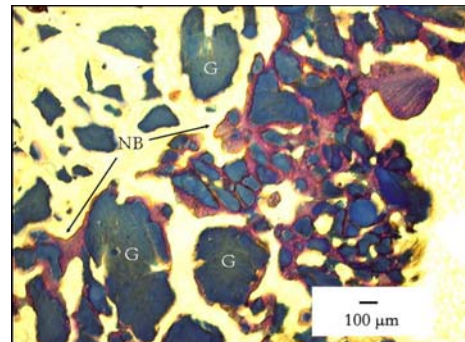


Abb. 4.36: Fragmentärer Zerfall von Ostim®, Ladewig-Färbung

Nur bei einem Tier zeigt das Ostim® nach acht Wochen einen fast vollständigen, fragmentären Zerfall in Partikel unterschiedlicher Größe. Zwischen diesen Partikeln liegt lockeres Bindegewebe, welches bis in das Zentrum des Implantates reicht. In der Peripherie finden sich schmale Geflechtknochen trabekel, die das Implantat zum Teil vollständig einschließen (Abb. 4.36). In der *Giemsa-Färbung* lassen sich im lockeren, zellarmen Bindegewebe vereinzelte Rundzellen erkennen (Abb. 4.37).

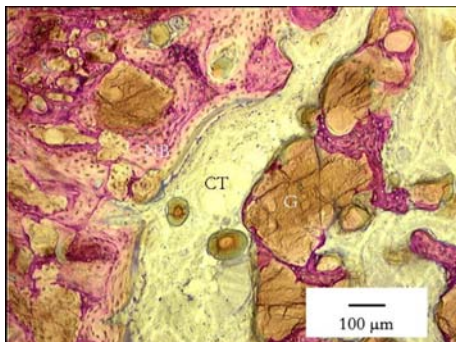


Abb. 4.37: Bindegewebe mit vereinzelten Rundzellen

Ostim® in Kombination mit autogener Spongiosa

Bei vier von acht Tieren liegt das Implantat im distalen Femur nur minimal knöchern integriert vor. Es finden sich, vom Wirtsknochen ausgehend, eine bindegewebige Abgrenzung und kleinere Bälkchen von Geflechtknochen. In der Peripherie des Implantates sind nur kleinere abgelöste Ostimpartikel von Knochenbälkchen umschlossen (Abb. 4.38).

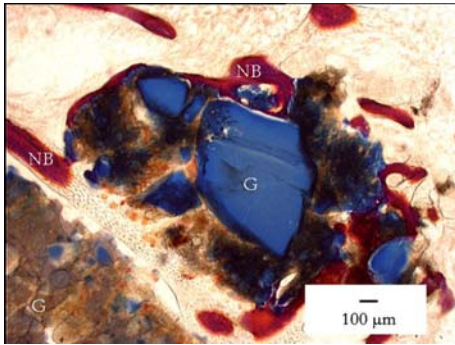


Abb. 4.38: Abgelöster Ostimpartikel mit Geflechtknochen, Ladewig-Färbung

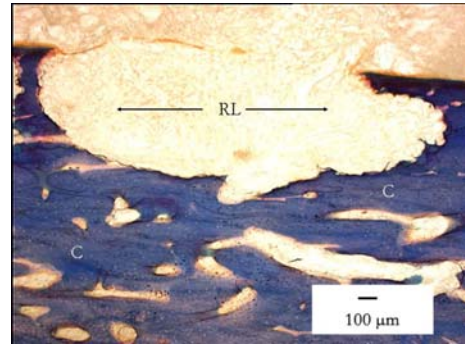


Abb. 4.39: Resorptionslakune in der Diaphyse, Ladewig-Färbung

Die diaphysären Anteile der Femura zeigen wiederholt Resorptionslakunen (Abb. 4.39). In der *Giemsa-Färbung* stellen sich wieder im lockeren, kollagenem Bindegewebe, welches das Implantat zu großen Teilen umgibt, zahlreiche Rundzellen dar (Abb. 4.40).

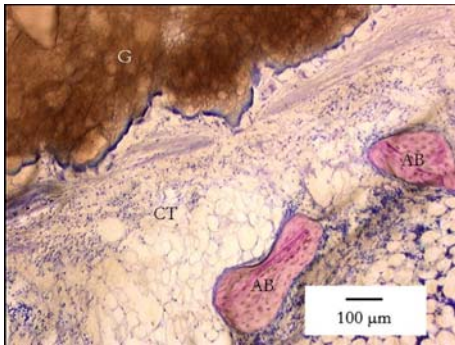


Abb. 4.40: Interponiertes Bindegewebe mit Rundzellen, Giemsa-Färbung

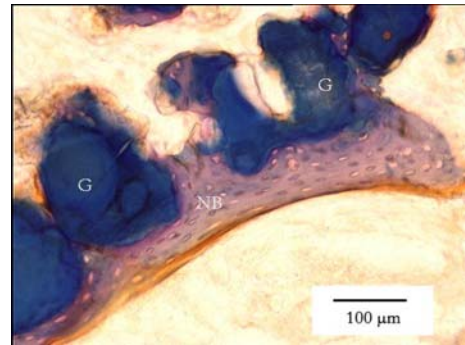


Abb. 4.41: Ostim® mit neugebildetem Knochen, Ladewig-Färbung

Bei den übrigen vier Tieren ist ein kleinscholliger Zerfall des Implantates mit angrenzender Herausbildung zahlreicher, dünner Geflechtknochen trabekel, einschließlich eines lamellären Umbau zu beobachten (Abb. 4.41).

Ostim® in Kombination mit allogener Spongiosa

Bei sechs von acht Tieren ist das Implantat von einem schmalen, bindegewebigen Saum und partiell auch von schmalen Knochen trabekeln umschlossen (Abb. 4.42).

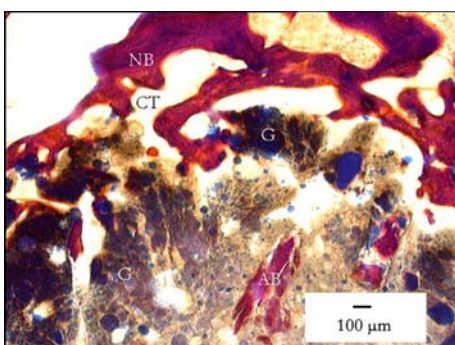


Abb. 4.42: Oberflächliche Knochenneubildung mit interponiertem Bindegewebe, Ladewig-Färbung

Die Diaphysen lassen wiederum langstreckige Resorptionszonen und Kallusauflagerungen endosteal und periosteal erkennen. Es kommt zu einer regelrechten Verjüngung der kortikalen Strukturen (Abb. 4.43).

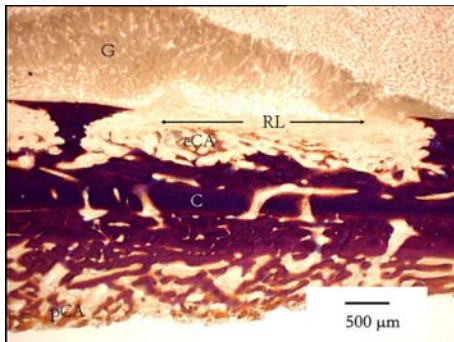


Abb. 4.43: Diaphysale Resorptionslakune mit endostealer Kallusbildung, Ladewig-Färbung

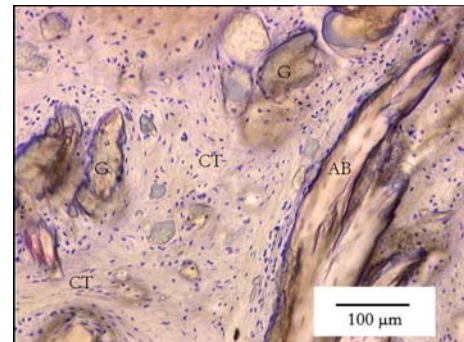


Abb. 4.44: Interponiertes Bindegewebe mit Rundzellen, Giemsa-Färbung

In der *Giemsa-Färbung* lässt sich bei den Präparaten ein weitmaschiges, lockeres Bindegewebe zwischen dem transplantierten Knochen bzw. den Ostimpartikeln erkennen, dass zahlreiche einkernige Rundzellen und Fibrozyten enthält. Mehrkernige Riesenzellen sind nicht zu finden (Abb. 4.44). Die transplantierte Spongiosa ist zum Teil noch in das Ostim[®] eingebettet, zum Teil hat der neu gebildete Knochen Anschluss an das Transplantat stattgefunden (Abb. 4.45).

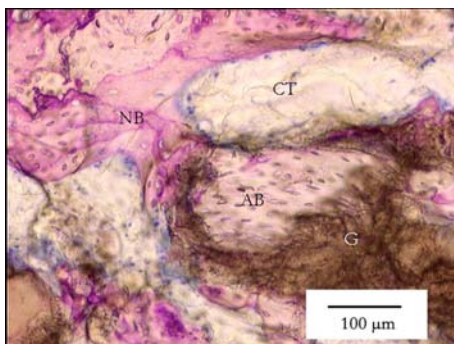


Abb. 4.45: Allogenes Knochengewebe an Geflechtknochen und Ostim[®] angrenzend, Giemsa-Färbung

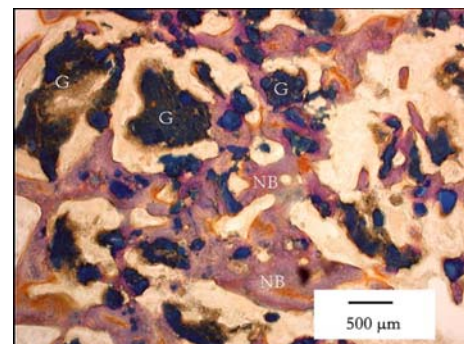


Abb. 4.46: Kleinschollig zerfallenes Implantat mit Geflechtknochen, Ladewig-Färbung

Bei den anderen beiden Versuchstieren findet sich ein vollständig kleinscholliger Zerfall des Implantates. In der Metaphyse der Femura liegen nur noch wenige kleinschollige Reste des Ostims[®], die zum großen Teil von schmalen Geflechtknochenbälkchen umgeben sind. Das im Bohrkanal vorliegende, engmaschige Netzwerk trabekulären Knochens lässt bereits einzelne Zonen lamellären Umbaus erkennen (Abb. 4.46).

4.1.5 Zwölf Wochen postoperativ

Ostim[®] allein

Das histologische Bild hat sich im Vergleich zum Implantationszeitraum nach acht Wochen kaum verändert. Bei sechs von acht Tieren liegt das Ostim[®] auch zu diesem Zeitpunkt weitgehend unverändert eingeschlossen in der Femurmetaphyse vor. In der Peripherie beginnt es sich kleinschollig aufzulösen und es bildet sich ein peripherer Saum aus schmalen Knochen trabekeln. Im Zentrum zeigt es einen grobfragmentären Zerfall und lässt sich nur schwer anfärben. Bei vier dieser Tiere sind Teilmengen des Ostims[®] in die Diaphyse gelangt. In deren unmittelbarer Umgebung ist eine feinmaschige, trabekuläre Osteoneogenese zu erkennen (Abb. 4.47).

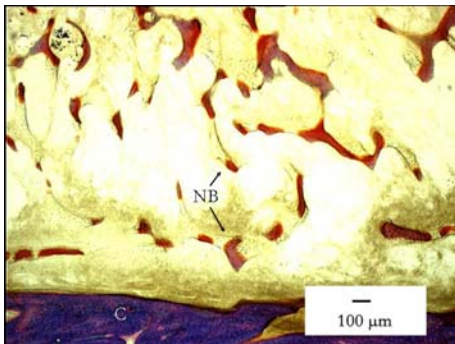


Abb. 4.48: Knochenneubildung in der Nähe der Diaphyse, Ladewig-Färbung

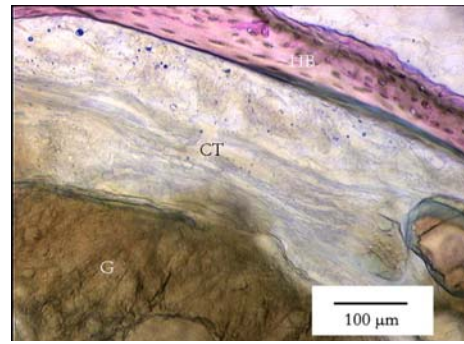


Abb. 4.47: Interponiertes Bindegewebe, Giemsa-Färbung

In der *Giemsa-Färbung* zeigt sich in der Umgebung der Implantate ein lockeres, meist zellarmes und faserreiches Bindegewebe. Bei Tieren mit geringem Implantatzerfall und ausbleibender Resorption grenzt es das Ostim[®] gegen den umgebenden Knochen ab (Abb. 4.48). Nur bei zwei von acht Tieren ist ein kleinscholliger Zerfall des Ostims[®] und ein ausgeprägt trabekuläres Knochenwachstum zwischen den Implantatpartikeln zu beobachten. Beim ersten Tier sind die Abstände zwischen den verbliebenen Ostimfragmenten klein und es haben sich dazwischen nur schmale Knochen trabekel gebildet (Abb. 4.49).

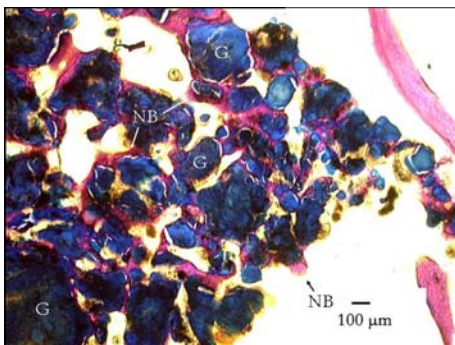


Abb. 4.49: Kleinscholliger Zerfall des Implantates mit interponierter Osteogenese, Ladewig-Färbung

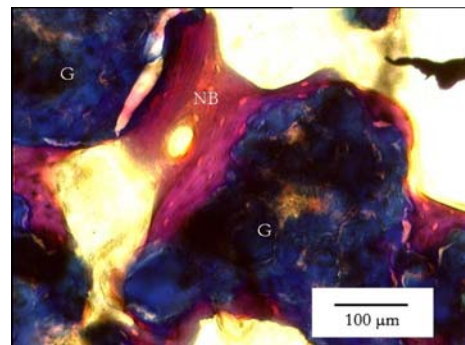


Abb. 4.50: Lamellär umgebauter Knochen trabekel, Ladewig-Färbung

Bei stärkerer Vergrößerung lässt sich nun in der unmittelbaren Nähe des Implantates vermehrt ein lamellärer Umbau der Knochen trabekel dokumentieren (Abb. 4.50). Beim zweiten Tier liegen die Implantatfragmente mit ausgeprägter trabekulärer Knochenneubildung weiter auseinander. Die neu gebildeten Knochen trabekel sind deutlich breiter und kräftiger als beim vorhergehenden Tier und haben eine lamelläre Strukturierung. Nur in unmittelbarem Kontakt zum Implantat gibt sich Geflechtknochen zu erkennen (Abb. 4.51).

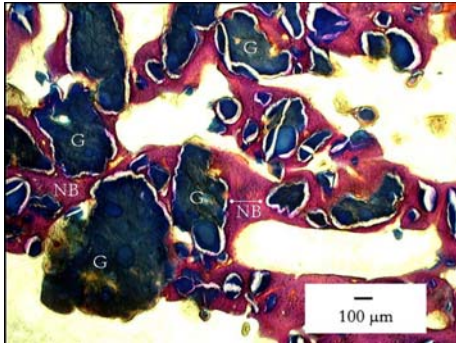


Abb. 4.51: Eingeschlossenes Ostim® mit Geflechtknochen, Ladewig-Färbung

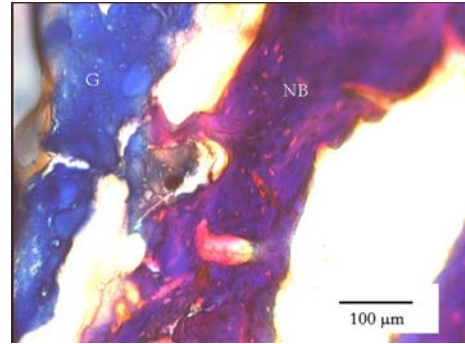


Abb. 4.52: Vom Wirtsknochen ausgehende Osteogenese, Ladewig-Färbung

Ostim® in Kombination mit autogener Spongiosa

Bei fünf von acht Tieren liegt das Implantat aus Ostim® und autogener Spongiosa als kompakte Masse weitgehend unverändert im Bohrkanal. Am freien Rand zeigt das Implantat nur an wenigen Stellen direkten Kontakt zum Lagerknochen. Dort ist vom Wirtsknochen ausgehend eine trabekuläre Knochenneubildung erkennbar (Abb. 4.52). In der *Giems*a-Färbung zeigt sich in der Umgebung des Implantates meist ein lockeres, faserreiches und zellarmes Bindegewebe. Fremdkörperriesenzellen sind nicht zu finden. Vielmehr liegen in dem Bindegewebe vereinzelt Rundzellen und Fibrozyten (Abb. 4.53).

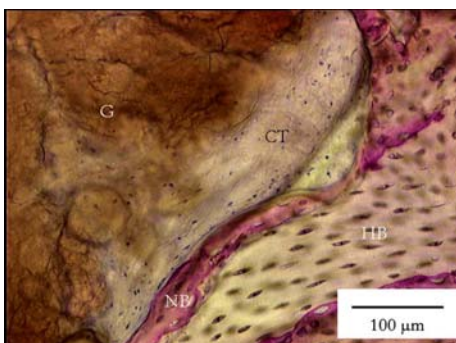


Abb. 4.53: Interponiertes Bindegewebe zwischen Implantat und Lagerknochen, Giemsa-Färbung

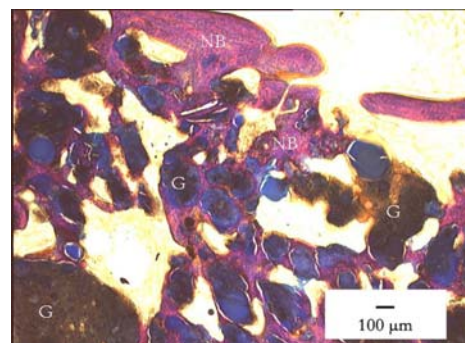


Abb. 4.54: Grobscholliger Implantatzerfall mit Osteogenese, Ladewig-Färbung

Nur bei zwei der acht Tiere ist das Implantat zumindest teilweise grobschollig zerfallen und die kleineren Bruchstücke des Ostims[®] werden von einem dichten Flechtwerk breiter Trabekel eingeschlossen. Die Trabekel bestehen auch nach zwölf Wochen noch überwiegend aus Geflechtknochen, partiell sind lamelläre Strukturierungen sichtbar (Abb. 4.54). An der Kortikalis der Metaphyse zeigen sich bei einem Tier ausgedehnt resorptive Vorgänge an der Grenze zum Implantat (Abb. 4.55).

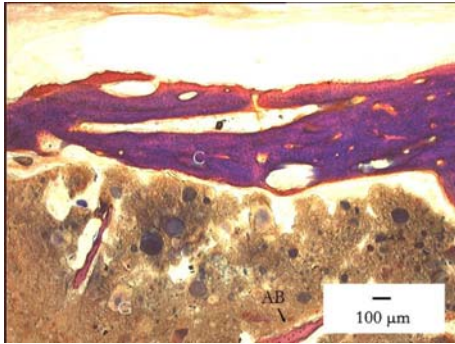


Abb. 4.55: Vershmälerte Kortikalis mit Zeichen der Resorption, Ladewig-Färbung

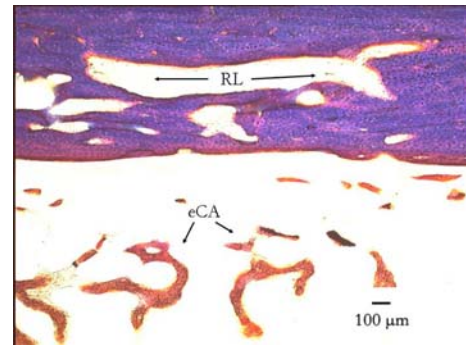


Abb. 4.56: Resorptionslakune und endosteale Kallusbildung, Ladewig-Färbung

Bei sechs von acht Tieren finden sich auch wieder Resorptionslakunen in der Kompakta der Diaphyse, zum Teil mit extremer Ausdünnung des Rindenknochens und Bildung eines periostalen und endostalen Reparaturkallus (Abb. 4.56).

Ostim[®] in Kombination mit allogener Spongiosa

Sieben von acht Tieren dieser Versuchsgruppe zeigen ein weitgehend unverändertes Implantat im Bohrkanal. Es ist bei den einzelnen Tieren in unterschiedlichem Ausmaß an seiner Oberfläche von trabekulärem Knochen bedeckt (Abb. 4.57).

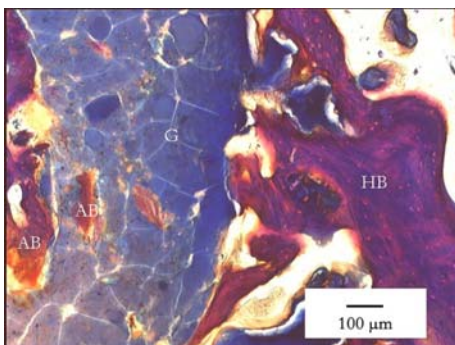


Abb. 4.57: Interface zwischen Implantat und Lagerknochen, Ladewig-Färbung

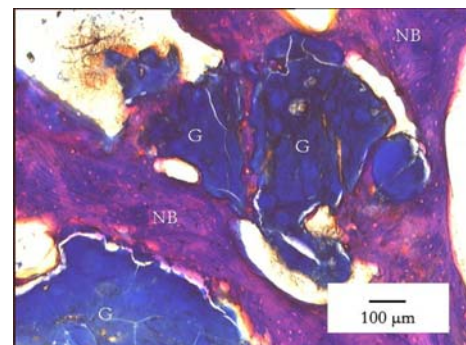


Abb. 4.58: Eingeschlossene Ostimpartikel, Ladewig-Färbung

Einzelne, sich abgelöste Partikel des Implantates sind hoch verdichtet, weisen eine stark basophile Struktur auf und sind in das trabekuläre Maschenwerk eingeschlossen (Abb. 4.58).

Die *Giemsa-Färbung* zeigt, wie bereits in den übrigen Versuchsgruppen beschrieben, an der Grenzfläche zwischen Implantat und Lagerknochen sowie in den Räumen zwischen größeren Implantatbruchstücken, ein lockeres, faserreiches und zellarmes Bindegewebe. In diesem Gewebe sind hauptsächlich mononukleäre Rundzellen und Fibrozyten zu beobachten (Abb. 4.59).

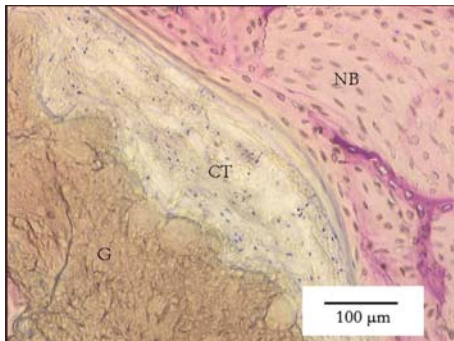


Abb. 4.59: Interponiertes Bindegewebe zwischen Geflechtknochen und Ostim[®], Giemsa-Färbung

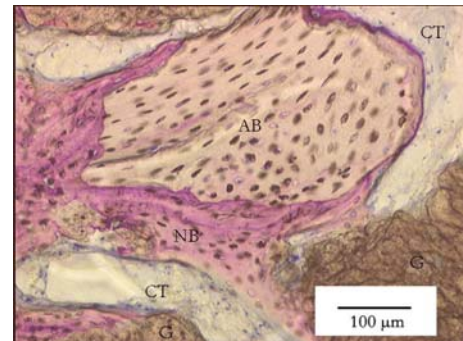


Abb. 4.60: Von Geflechtknochen umschlossenes allogenenes Knochengewebe, Giemsa-Färbung

Die zugegebenen allogenenen Knochenimplantate werden bei der Mehrzahl der Präparate in den neugebildeten, trabekulären Knochen eingeschlossen. Das umgebende Ostim[®] ist an dieser Stelle von einwachsendem, lockerem Bindegewebe separiert. (Abb. 4.60). Bei einem einzigen Tier ist es abermals zu resorptiven Umbauvorgängen in der Kortikalis der Diaphyse gekommen. Hier findet sich eine Strukturauflockerung und im Markraum sind zahlreiche schmale Geflechtknochenstrabekel zu erkennen (Abb. 4.61).

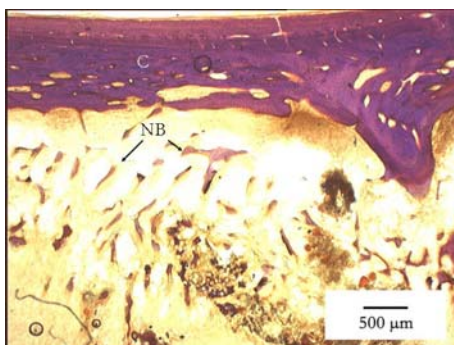


Abb. 4.61: Strukturauflockerung der Kompakta der Diaphyse und endostealer Osteogenese, Ladewig-Färbung

4.1.6 Zusammenfassung der histologischen Befunde

In Tab. 4.1 sind die histomorphologischen Befunde in einer Übersicht zusammengefasst.

Tab. 4.1: Zusammenfassung und Übersicht der histomorphologischen Befunde

	Ostim® allein	Ostim® in Kombination mit autogenem Knochen	Ostim® in Kombination mit allogenen Knochen
2 Wochen	nur randständiger Zerfall des Implantates, randständige Geflechtknochenbildung vom Wirtsknochen ausgehend, kaum bindegewebsfreier Kontakt zwischen Knochen und Implantat, stellenweises Vorwachsen v. Faserknochen zw. Konglomerate	2 Gruppen: 1.: komplett scholliger Zerfall v. Ostim, randständige Knochenneubildung, Faserknochen v. Osteoblasten bedeckt 2.: nur randständig abgesprengte Fragmente mit Geflechtknochenbildung, interponiertes Bindegewebe	randständiger bruchstückhafter Zerfall des Implantates, teilweise Geflechtknochenbildung am Implantatrand, vollständig von Bindegewebe umgeben, avitaler allogener Knochen
4 Wochen	groscholliger Zerfall am Rand, kompakte Implantatsituation im Zentrum, 2 Gruppen: 1.: intensive Knochenneubildung vom Lager aus, interponiertes Bindegewebe 2.: Implantat unverändert, minimale Knochenneubildung	oberflächliche Knochenneubildung, interponiertes Bindegewebe im Interface, eingebrachtes Knochenmaterial unterliegt keinerlei Umgebungsreaktion, großflächig, kompletter Implantat- Zerfall nur bei einem Versuchstier	2 Gruppen: 1.: komplett kleinscholliger Zerfall, randständige Knochenneubildung, bindegewebsfreies Interface, allogenenes Knochenmaterial integriert, 2.: randständiger Implantatzerfall, im Zentrum kompakte Implantatsituation, avitaler, allogener Knochen
6 Wochen	überwiegend randständiger Zerfall des Implantates mit Knochenneubildung in das Implantat, an vielen Stellen Bindegewebe im Interface, kompaktes Implantat im Zentrum, keine Fremdkörperriesenzellen	überwiegend komplett kleinscholliger Zerfall des Implantates, kräftige, randständige Knochenneubildung,	2 Gruppen: 1.: unverändertes Implantat, umscheidet von Bindegewebe, randständige Knochenneubildung 2.: komplett kleinscholliger Zerfall, in beiden Gruppen endostale Resorptionszonen
8 Wochen	überwiegend (7 von 8) unveränderte Implantatsituation, umgeben von Bindegewebe, randständig kleinscholliger Zerfall Knochenneubildung vom Wirtsknochen aus, Resorptionsareale in der Diaphyse, end- und periostale Kallusbildung	2 Gruppen: 1.: randständiger Zerfall, geringe Knochenneubildung, interponiertes Bindegewebe, Resorptionslakunen diaphysär, 2.: komplett kleinscholliger Zerfall, lamellärem Umbau des Geflechtknochens	kompaktes Implantatzentrum, randständig Knochen trabekel, interponiertes Bindegewebe, eingebrachter Knochen z. T. integriert, Resorptionszonen und Kallusauflagerung
12 Wochen	Implantat unverändert (6 von 8), peripherer Zerfall, peripher schmale Knochen trabekel, interponiertes Bindegewebe	Implantat unverändert, intermittierend direkter Lagerkontakt, Knochenneubildung, Resorptionslakunen diaphysär	überwiegend unveränderte Implantatsituation, interponiertes Bindegewebe mit Knochenneubildung an Kontaktstellen zum Wirtsknochen

4.2 Histomorphometrische Ergebnisse

Die Resorption von Ostim® und die Knochenneubildung werden anhand histomorphometrischer Strukturparameter zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten aufgezeichnet. Zur Darstellung kommen diese in den Säulendiagrammen als Mittelwerte mit deren Standardabweichungen als senkrechte Fehlerbalken darüber. Sich signifikant zueinander verhaltende Säulen werden mit einer Klammer verbunden und mit einem * versehen gekennzeichnet. Die Definition der Strukturparameter erfolgte analog zu den von *Parfitt* [77] beschriebenen Histomorphometrie- Parametern. Als erster Strukturparameter wird der Anteil der gemessenen

Knochenfläche zur gesamten Messfläche für alle Gruppen dargestellt (BV/TV). Danach folgt die Trabekeldicke ($Tb.Th.$). Diese beiden Messwerte wurden direkt während des Messprozesses erhoben. Ausgehend davon wurden dann die geschätzten Parameter Trabekelanzahl ($Tb.N$) und die Trabekelseparation ($Tb.Sp$) errechnet.

4.2.1 Vergleiche der Anteile der Knochenfläche (in Prozent) im zeitlichen Verlauf

Diese Einflussgröße gehört zu den Strukturparametern der Histomorphometrie und ist nach Parfitt [76] ein nützlicher Index zur adäquaten Beschreibung von strukturellen Effekten auf das Knochengewebe bedingt durch Krankheit und Alter. Gemessen wird dabei die tatsächliche Knochenfläche. Anschließend erfolgt die Division durch die Fläche des Messareales.

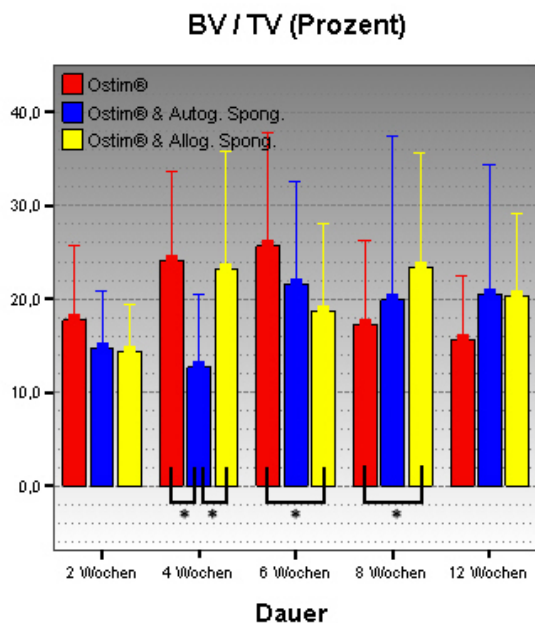


Abb. 4.62: Vergleich der Knochenanteile (in Prozent) innerhalb des Messfeldes, Mittelwert und Standardabweichung, mit * versehene Bezugslinien kennzeichnen Signifikanz

Ostim[®] allein als Implantat zeigt gegenüber der Kombination *Ostim*[®]/autogene Spongiosa bis zum Erreichen seines Maximums in der sechsten Woche tendenziell höhere Werte. Im weiteren Verlauf zeigt das Kombinationsimplantat ein zunehmend höheres Niveau, welches *Ostim*[®] allein bis zur zwölften Woche, mit weiter abnehmenden Werten, nicht halten bzw. erreichen kann (Abb. 4.62). Als signifikant mit einem $p < 0,001$ wurde dabei nur der Unterschied in der vierten Woche berechnet. Ein kontinuierlicher Zuwachs an neugebildetem Knochen konnte nicht nachgewiesen werden.

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach zwei Wochen liegt *Ostim*[®] allein mit seinem Knochenflächenanteil auch über dem des *Ostim*[®]/allogene Spongiosa. Dies hält sich über die vierte bis zu seinem Maximum in der sechsten Woche (Abb. 4.62). Danach fallen die Werte kontinuierlich ab. *Ostim*[®]/allogene Spongiosa verhält sich dazu bis zur vierten Woche ähnlich.

Die Differenz zwischen beiden Zeitpunkten hinsichtlich der Flächenanteile ist jedoch größer. Durch ein Absinken der Werte in der sechsten Woche ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ zwischen beiden Implantatgruppen, der sich aber schon einen Untersuchungszeitpunkt später gegensätzlich und ebenso signifikant mit $p < 0,05$ darstellt. Zum Endpunkt bietet das Kombinationsimplantat bezüglich der Knochenfläche einen größeren Anteil (Abb. 4.62). Ein über alle Untersuchungszeiträume kontinuierlicher Einfluss des beigemischten allogenen Knochengewebes konnte auch hier nicht gefunden werden.

Beim Vergleich der beiden Kombinationsgruppen miteinander fallen zu Beginn der Untersuchung hinsichtlich der Flächenaufteilung gleiche Anteile an (Abb. 4.62). Nach vier Wochen hat sich das Verhältnis mit einem $p < 0,001$ hochsignifikant verändert. *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* nehmen dabei einen größeren Flächenanteil ein. Von der sechsten bis zwölften Untersuchungswoche verbleiben *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* und *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* auf gleich hohen Anteilen und unterscheiden sich nur noch minimal voneinander (Abb. 4.62).

4.2.2 Vergleiche der Trabekeldicke (in μm) im zeitlichen Verlauf

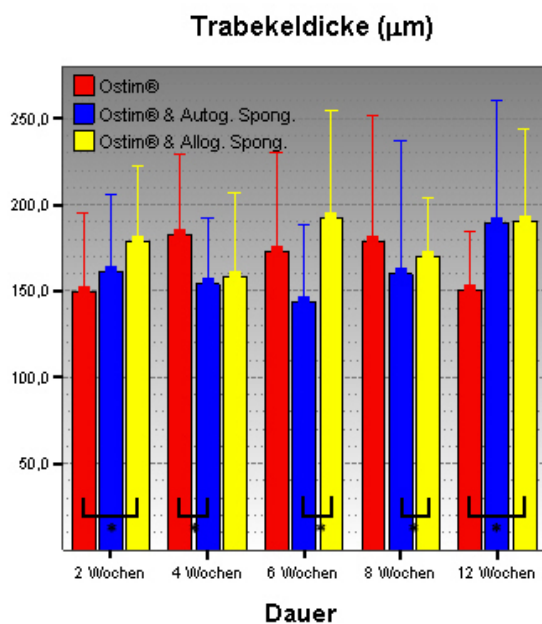


Abb. 4.63: Vergleich der Trabekeldicken (in μm) im zeitlichen Verlauf, Mittelwert mit Standardabweichung, mit * versehene Bezugslinien kennzeichnen Signifikanz

Primär weist das Kombinationsimplantat mit autogenem Knochen im Vergleich zu *Ostim*[®] *allein* eine größere Trabekeldicke auf. Zum Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen haben sich die Verhältnisse umgekehrt (Abb. 4.63). *Ostim*[®] *allein* besitzt eine signifikant größere Trabekeldicke mit einem $p < 0,05$. Tendenziell hält sich dieses Stellung der Versuchsgruppen zueinander über die sechste bis zur achten Woche. In der zwölften Versuchswoche kehrt sich

das Verhältnis wieder um. Das Kombinationsimplantat zeigt eine deutlich größere Trabekeldicke als *Ostim® allein*.

Der erste Beobachtungszeitpunkt beim Vergleich von *Ostim® allein* und *Ostim®/allogene Spongiosa* verdeutlicht signifikante Unterschiede mit einem $p < 0,05$ zwischen beiden Implantatgruppen und weist dem Kombinationsimplantat den größeren Wert zu. Zum darauf folgenden Zeitpunkt nach vier Wochen haben sich die Verhältnisse bereits umgekehrt (Abb. 4.63). *Ostim® allein* bietet auch zu den beiden späteren Zeitpunkten ähnliche Werte. In der zwölften Untersuchungswoche nimmt die Trabekeldicke wieder ab. Ähnlich verhält sich *Ostim®/allogene Spongiosa*. In der sechsten Woche nimmt die Trabekeldicke zu, um dann bis zum Schluss auf hohem Niveau zu verbleiben. Dadurch ergibt sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Implantatgruppen zum letzten Untersuchungszeitpunkt mit einem $p < 0,05$.

Das Verhalten beider Kombinationsimplantate zueinander kann als konform verlaufend beobachtet werden (Abb. 4.63). *Ostim®/allogene Spongiosa* bietet dem gesamten Verlauf über eine größere Trabekeldicke. Zu signifikanten Unterschieden kommt es in der sechsten und achten Woche mit jeweils einem $p < 0,05$. Bis zu diesem Zeitpunkt verzeichnen beide Gruppen von Beginn an abnehmende Werte. In der sechsten als auch in der achten Woche sind die dickeren Trabekel in der Implantatgruppe *Ostim®/allogene Spongiosa* zu finden. In der zwölften Untersuchungswoche liegen die Trabekeldicken beider Gruppen auf gleichem Niveau (Abb. 4.63).

4.2.3 Vergleich der Anzahl der Trabekel (pro mm) im zeitlichen Verlauf

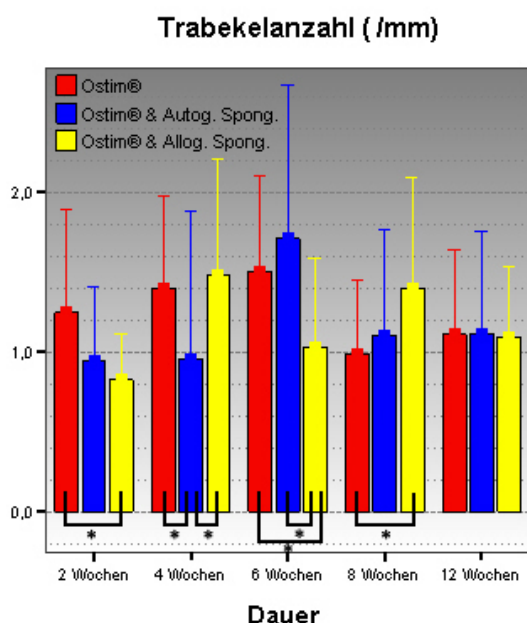


Abb. 4.64: Vergleich der Anzahl der Trabekel (pro mm) im zeitlichen Verlauf; Mittelwerte und Standardabweichung; mit * versehene Bezugslinien kennzeichnen Signifikanz

In den ersten sechs Wochen zeigt *Ostim*[®] *allein* einen kontinuierlichen Anstieg der Werte für die Anzahl der Trabekel. In der achten Woche fällt dieser ab und zeigt noch einmal eine leichte Steigerung zur zwölften Woche hin (Abb. 4.64). Das Kombinationsimplantat *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* hingegen verharrt nach den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten auf fast identischen Werten, was zu einem signifikanten Unterschied mit einem $p < 0,05$ zwischen beiden Implantatgruppen nach der vierten Woche führt. In der sechsten Woche kommt es zu einem weiteren Knochenwachstum. Nach der achten Woche ist bei beiden Implantattypen eine Regression zu verzeichnen. Hier bieten beide Gruppen eine ähnliche Anzahl, wie in diesem als auch im darauf folgenden Zeitfenster (Abb. 4.64).

Beim Vergleich der Kontrollgruppe *Ostim*[®] *allein* mit dem Kombinationsimplantat *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* zeigen sich zum ersten Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich der Trabekelanzahl als histomorphometrisches Kriterium. *Ostim*[®] *allein* weist hier gegenüber *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* mit einem $p < 0,05$ die signifikant größere Anzahl auf (Abb. 4.64). Vier Wochen nach Implantation liegen beide Implantatgruppen auf gleichem Niveau. In der sechsten Untersuchungswoche steigt die Anzahl der Trabekel bei der Gruppe *Ostim*[®] *allein* weiter an, wohingegen das Kombinationsimplantat *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* seine Anzahl wieder verringert. Beide Veränderungen führen zu einem hochsignifikanten Unterschied mit einem $p < 0,001$. Zum darauf folgenden Untersuchungszeitpunkt in der achten Woche haben sich die Verhältnisse völlig umgekehrt. Es kann ein Unterschied auf signifikantem Niveau mit einem $p < 0,05$ festgestellt werden (Abb. 4.64). Nach zwölf Untersuchungswochen weisen beide Implantatgruppen gleiche Werte auf. Tendenziell lässt sich ein Anstieg über die gesamte Versuchsdauer für die Implantate mit *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* feststellen.

Die Anzahl der Trabekel in den Implantatgruppen *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* bzw. *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* nehmen tendenziell für beide Gruppen zu (Abb. 4.64). Unterbrochen werden sie von signifikanten Unterschieden in der vierten Woche und sechsten Woche mit einem $p < 0,05$, in denen sich die Verhältnisse beider Gruppen zu diesen Zeitpunkten konträr zueinander verhalten (Abb. 4.64). In der achten und zwölften Woche bietet *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* fast identische Werte. *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* zeigt in der achten Woche noch eine größere Anzahl an Trabekeln, welche sich aber zur zwölften Woche hin der Gruppe *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* angleicht.

4.2.4 Vergleich der Trabekel- Separation (in μm) im zeitlichen Verlauf

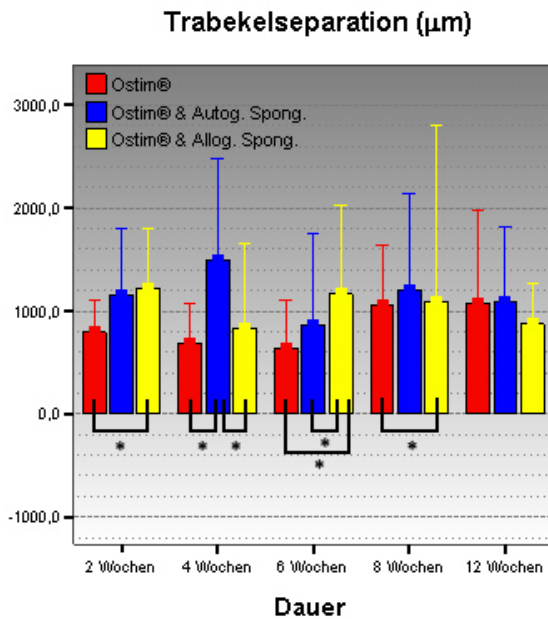


Abb. 4.65: Vergleich der Trabekelzwischenräume (in μm) im zeitlichen Verlauf; Mittelwert und Standardabweichung; mit * versehene Bezuglinien kennzeichnen Signifikanz

Der Abstand der Trabekel zueinander nimmt in der Gruppe *Ostim® allein* bei Vergleich mit *Ostim®/autogene Spongiosa* bis zur sechsten Woche kontinuierlich ab (Abb. 4.65). Das entspricht auch der logischen Konsequenz bei zunehmender Trabekelanzahl (Abb. 4.64). Zur achten und zwölften Woche hin nehmen die Werte wieder zu. Die Abstände bei *Ostim®/autogene Spongiosa* verhalten sich dazu in der zweiten als auch in der vierten Woche konträr. Hochsignifikant deutlich wird dies in der vierten Woche. In der sechsten Woche folgt ein Abfall der Abstände zwischen den Trabekeln. In der achten und zwölften Woche stellt sich zwischen den verschiedenen Implantatgruppen ein „steady state“ ein, wobei die Unterschiede zum letzten Untersuchungszeitpunkt minimal sind.

Der Vergleich der Trabekelzwischenräume von *Ostim® allein* und *Ostim®/allogene Spongiosa* zeigt schon zum ersten Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede mit einem $p < 0,05$ (Abb. 4.65). Das Kombinationsimplantat besitzt hierbei einen größeren Abstand zwischen den Trabekeln. Vier Wochen post operationem sind die Abstände in beiden Gruppen kleiner geworden. Nach sechs Wochen ist ein weiteres Zusammenrücken der Trabekel in der Gruppe *Ostim® allein* zu beobachten. Das Kombinationsimplantat vergrößert hingegen seine Abstände zwischen den Trabekeln, so dass nunmehr wieder ein signifikanter Unterschied mit einem $p < 0,05$ zwischen beiden Gruppen besteht (Abb. 4.65). Rechnerisch ergibt sich auch eine Unterschied auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ in der achten Woche. Beide Gruppen, verglichen an deren Mittelwerten, liegen gleich auf (Abb. 4.65). Der rechnerische Unterschied erklärt sich jedoch durch die Standardabweichung der Gruppe *Ostim®/allogene Spongiosa*.

Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach zwölf Wochen besteht kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen.

Die Differenzen in den Abständen zwischen den Trabekeln der beiden Kombinationsimplantate zueinander werden zu den Untersuchungszeitpunkten vier und sechs Wochen post operationem als signifikant mit einem $p < 0,05$ errechnet (Abb. 4.65). Deutlich wird dabei auch der sich konträr zueinander verhaltende Verlauf beider Implantatgruppen zu diesen beiden Untersuchungszeitpunkten. In der vierten Woche zeigt sich *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* mit größeren Abständen zwischen den Trabekeln. Zum darauf folgenden Untersuchungszeitpunkt sind die Abstände des Implantates *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* vergrößert. Ein harmonisches Bild zeigen die Abstände zu den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten in der achten bzw. zwölften Woche. Hier verhalten sich die beiden zu untersuchenden Implantatgruppen konform mit abnehmenden Werten zueinander (Abb. 4.65).

5 Diskussion

Zur Überbrückung von Knochendefekten nach einem Trauma oder nach Tumorresektion ist die Transplantation von autogenem und allogenen Knochen heute eine gebräuchliche Methode. Beide Verfahren, die heute zu den Standardverfahren der klinischen Versorgung gehören, haben allerdings Nachteile, die es bei der Indikationsstellung zur Applikation abzuwägen gilt.

Der Einsatz autogenen Knochens beinhaltet alle Risiken eines zweiten Eingriffs und speziell bei der Entnahme am Beckenkamm hat er zusätzlich negative Begleiterscheinungen wie Witterfähigkeit, Belastungsschmerzen und Taubheitsgefühl [109]. Die Verfügbarkeit des autogenen Knochens ist für jeden Patienten als weiteres Kriterium zu prüfen. Gerade ältere Menschen können in diesen Situationen nur einen geringen Umfang an Knochenmaterial zur Verfügung stellen.

Allogener Knochen, als weit verbreitete Alternative, bringt die Gefahr mit sich, dass es zu einer Übertragung von Krankheitserregern kommen kann. Dabei stehen Infektionen mit dem HI- oder Hepatitis-Viren an erster Stelle. Gleichwohl spielen bei diesen Überlegungen ebenso immunologische Aspekte eine Rolle. So gilt bislang das Gebot, die Übertragung von Rh-positivem Gewebe auf Rh-negative Patientinnen im gebärfähigen Alter zu vermeiden [45, 90].

Bei der Verwendung von Knochenersatzstoffen bestehen diese Risiken nicht. Auf der Suche nach dem perfekten Knochenersatzstoff, der verschiedensten Eigenschaften wie Biokompatibilität, Antigen-Freiheit, Sterilisierbarkeit, ausreichende Verfügbarkeit und Osteokonduktivität in sich vereinen sollte [94], haben sich heute eine Vielzahl von verschiedenen Materialien etabliert.

In unseren Versuchen wurde eine Hydroxylapatit- Keramik mit kristalliner Struktur in Verbindung mit unterschiedlichen Knochentransplantaten untersucht. Dabei handelte es sich um eine reine Hydroxylapatit- Wasser- Suspension, die weder gesintert wurde noch exo- oder endotherm nach Applikation im Operationssitus aushärtete. Diese Hydroxylapatit- Paste wurde in einem *critical-size-defect* am Versuchstier Kaninchen getestet. Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Einheilungsprozess zu verschiedenen Zeitpunkten. Das Versuchsprotokoll sah eine Kontrollgruppe vor, in der die Keramik ohne Zusätze zum Auffüllen des Knochendefektes benutzt wurde. In den beiden anderen Versuchsgruppen kam jeweils die Hydroxylapatit- Paste mit autogenem oder allogenen Knochen in einem festgelegten Mischungsverhältnis zum Einsatz. Das Ziel dieser Untersuchungen sollten sowohl die Untersuchung des Einheilungsverhaltens der Keramik allein und in Verbindung mit Knochengewebe- transplantaten

sein, als auch die Beantwortung der Frage, welche Effekte auf die knöcherne Heilung durch die Augmentation mit autogenem oder allogenen Knochen entstehen.

Die Integration von *Ostim*[®] *allein* ist histologisch als heterogen zu beurteilen. Einerseits stellt sich in einzelnen Befunden ein scholliger Zerfall mit Einschluss der Partikel in Knochen und bindegewebsfreier Lagersituation dar, andererseits kann man eine nur zögerliche Integration, mit einer zum großen Teil bindegewebigen Einscheidung verfolgen, bei der eine Knochenneubildung nur oberflächlich zu beobachten ist. Histomorphometrisch lässt sich eine Zunahme des Knochenvolumens bis zur sechsten postoperativen Woche messen, die dann zwar zu den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten abfällt, jedoch signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Behandlungsgruppen aufweist.

Verglichen mit unseren Ergebnissen lässt sich in der Literatur ein ebenso ambivalentes Bild bei Untersuchungen mit Hydroxylapatit gewinnen.

Köster [59] stellte zum Beispiel bei seinen Untersuchungen mit einem Hydroxylapatit-Granulat an Schäferhunden verschiedene histopathologische Ergebnisse zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten vor. Nach drei Wochen konnte er an der Granulatoberfläche eine Neubildung von Knochenbälkchen feststellen. Die jungen Knochen trabekel waren mit einem feinen Osteoblastensaum überzogen. Weiterhin beobachtete er die ersten Resorptionsbuchten und das mit aktivem Knochenmark gefüllte, neugebildete, spongiöse Maschenwerk.

Nach sechs Wochen erfasste er eine quantitativ deutliche Knochengewebiszunahme im Vergleich zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt. Es existierte in diesem Moment ein ausdifferenziertes Maschenwerk, in welches das restliche Hydroxylapatitgranulat integriert war. Er beobachtete zusätzlich Knochenbälkchen, die, seiner Einschätzung nach, „resorptiv“ in den mit Granulat aufgefüllten Defekt eingewachsen waren.

Verglichen mit unseren Ergebnissen aus den ersten drei postoperativen Untersuchungszeitpunkten, können wir diese Befunde für *Ostim*[®] *allein* und die anderen Behandlungsgruppen bestätigen. Wir fanden ebenso eine bis zur sechsten Woche deutliche Zunahme des Knochenvolumens und wir stellten ebenso ein Vorwachsen von jungem Faserknochen zwischen die Implantatkonglomerate fest.

Allgemein kann man sagen, dass sich eine randständige Knochenneubildung in der überwiegenden Anzahl der Behandlungsgruppen vollzog. Hydroxylapatit- Inseln wurden knöchern umschlossen und Knochen trabekel bestanden aus vitalem Knochengewebe mit deutlichem Umbaugeschehen an der Oberfläche. Für das Hydroxylapatit gilt nach *Rueger* [85], dass es nach dem kompletten oder auch nur partiell knöchernem Einbau der Keramik zu keinem wei-

teren Abbau kommt. Es ist dann ein "osteointegrativer Verbund" entstanden. Dieser stellt sich so dar, dass nicht resorbierte Teile des Implantates einer Integration in den Knochen unterlagen und mit großer Wahrscheinlichkeit eine zukünftige Degradation nur noch im Bereich des Remodelings möglich sein wird. Dadurch können auch noch nach Jahren Hydroxylapatit-Reste nachweisbar sein. Die mechanische Belastbarkeit eines solchen Knochen-Implantat-Gerüsts scheint in diesem Fall dann aber ausreichend zu sein.

Ringförmige Einschlüsse von Ostim[®] durch neugebildeten Faserknochen beschrieben auch *Chris Arts et al.* [17]. Durch Anwendung einer TRAP-Färbung (*tartrate resistant acid phosphatase*) konnten in der unmittelbaren Umgebung Osteoklasten nachgewiesen werden, die in ihren Versuchen für ein aktives Remodeling sprachen.

Schnettler und Dingeldein [90] beschrieben einen kompletten Zerfall von Ostim[®] nach vier Wochen und das netzartige Wachstum von Faserknochen zwischen und um die Ostim[®]-Kügelchen herum. Nach vier bis sechs Wochen waren ihre *critical-size-defects* an Kaninchen und Schafen komplett mit Knochen ausgefüllt. Ihnen gelang gleichzeitig der Nachweis von Makrophagen und Osteoid bildenden Zellen in der direkten Nachbarschaft zu den Ostim[®]-Schollen.

Im Gegensatz zu dem sich ausbildenden Maschenwerk an neugebildeten Knochen schildert *Rueger* [87] in seinen Beobachtungen während der Untersuchungen mit einer Hydroxylapatit-Keramik, einen ganz anderen Befund: In seinen Präparaten konnte er ebenfalls an der Oberfläche eine Knochenneubildung beobachten. Auffällig erschien ihm aber, dass in keinem seiner Präparate es diesem neugebildeten Knochen gelang, in das Zentrum des mit Hydroxylapatit gefüllten Defektes vorzuwachsen.

Diese Beobachtungen konnten wir beim überwiegenden Teil unserer Tiere gleichfalls machen. Wir sahen mitunter auch nur eine auf die freie Oberfläche beschränkte Knochenneubildung ohne Eindringen von Knochengewebe in Richtung Defektzentrum. Im gleichen Zusammenhang lässt sich auch erwähnen, dass im Zentrum und in der Peripherie der Defekthöhle Ostim[®]-Inseln lagen, an denen keine knöcherne Integration beobachtet wurde.

Ein gleiches Bild zeichnete sich in der Arbeit von *Chris Arts et al.* [17] ab. Auch hier wurden nicht knöchern integrierte Reste von Ostim[®] nach acht Wochen beobachtet. Mit Hilfe der TRAP-Färbung konnte hier jedoch eine Resorption von Ostim[®] durch Osteoklasten nachgewiesen werden.

Die biologische Verträglichkeit von verschiedenen Hydroxylapatitkeramiken wurde in unterschiedlichen Zellkulturversuchen untersucht. Knochenmarkzellkulturen wurden dazu von

Wilke [107] eingesetzt und ausgewertet. Es zeigte sich dabei, dass Hydroxylapatitkeramiken und Titanverbindungen in dieser Versuchsanordnung die besten Ergebnisse erzielten. Ihnen konnte eine gute Biokompatibilität bestätigt werden. Von Interesse ist diese Arbeit insofern, als die Versuche mit Zellen humanen Ursprungs durchgeführt wurden und somit das Testverfahren eine physiologische Zellpopulation einschloss, auf welche das Implantat auch unter realen Therapiebedingungen treffen würde. Des Weiteren enthält die dabei eingesetzte Knochenmarkzellkultur auch undifferenzierte, mesenchymale Stammzellen, die sich in verschiedene Richtungen differenzieren können und somit die Möglichkeit bieten, die voraussichtliche lokale Gewebsreaktion abzuschätzen.

Klinische Untersuchungen zur Biokompatibilität von Hydroxylapatit- Keramik führte an 23 Patienten und deren histologischen Befunden *Liebendörfer* [65] durch. In den Ergebnissen fand sich eine überwiegend knöcherne Integration der Keramik. Ebenso konnte aber neben einer partiell- knöchernen Integration auch eine ossäre Verankerung von Keramik- Fragmenten dokumentiert werden.

Für *Schnettler und Dingeldein* [90] ergibt sich eine Biokompatibilität für synthetische Hydroxylapatite schon per se dadurch, dass Hydroxylapatit einen überwiegenden Anteil an der natürlichen Knochensubstanz ausmacht. Limitiert wird diese Bioverträglichkeit durch die Partikelgröße und die Phasenreinheit des Materials. Im Falle von *Ostim*[®] ist die Stöchiometrie entscheidend. Pures Hydroxylapatit hat ein Kalzium/ Phosphat- Verhältnis von 1,67. Das gleiche Verhältnis der beiden Komponenten zueinander liegt bei *Ostim*[®] vor.

Laschke et al. [63] untersuchten neben dem Verhältnis zur Angiogenese auch die Biokompatibilität von *Ostim*[®] mit Hilfe einer Tierversuchsanordnung am Syrischen Goldhamster. Hierbei bestätigte sich die gute Verträglichkeit von *Ostim*[®] bei Implantation in das muskuläre Weichteilgewebe. Dabei wurde innerhalb von 14 Tagen post operationem keine vom umgebenden Wirtsgewebe ausgehenden akuten Entzündungsreaktionen beobachtet. Als Indikator der Biokompatibilität wurde das Fehlen einer Leukozytenaktivität in den Blutgefäßen in unmittelbarer Nähe zum Implantat angesehen. Darüber hinaus verschlechterten sich auch die mikrohaemodynamischen Eigenschaften des Wirtslagers nach der Implantation von *Ostim*[®] nicht. Als Parameter wurden u. a. der Durchmesser und die Mittelachsengeschwindigkeit des Blutflusses innerhalb der postkapillaren Gefäße bewertet.

In unserer histologischen Auswertung zeigte *Ostim*[®] in allen Behandlungsgruppen an vielen Stellen über den gesamten Untersuchungszeitraum einen direkten Kontakt zum Lagerknochen ohne interponiertes Bindegewebe. Das Knochengewebe stellte sich am Ende der Versuchszeit

teilweise lamellär strukturiert und zum Teil als Geflechtknochen dar. Ein explizites Ausrichten der Knochenneubildung auf die zugegebenen autogenen und allogenen Knochenmaterialien in den beiden Augmentationsgruppen im Sinne einer Osteokonduktion in Richtung Defektzentrum konnten wir nicht beobachten. Ein Vorwachsen neuen Knochens vom Defektlager aus war insbesondere an den Stellen zu beobachten, an denen eine ausgiebige Fragmentation an der äußeren Implantatgrenze erfolgte.

Ausschlaggebend für eine Integration und Resorption sind nach *Weinländer et al.* [106], die ein Hydroxylapatit-Granulat bei einem monokortikomedullärem Defekt am Kaninchen untersuchten, neben der Biokompatibilität ebenso die chemische Zusammensetzung und seine Oberflächenbeschaffenheit. Als mögliche Wege der Resorption ihrer Hydroxylapatit-Keramik führten sie einerseits die Halisterese, also die Lösung in Flüssigkeiten, an und andererseits die zellabhängige Phagozytose.

In diesen Überlegungen beeinflussen die chemische Zusammensetzung die Halisterese und die Oberflächenverhältnisse den zellbedingten Abbau. Nach *Reif et al.* [78] hat bei der Anwendung von Hydroxylapatit die Phagozytose die erste Priorität. In Bezug auf deren Lokalisation an der Oberfläche wurde dabei die Porosität, die sich jeweils in eine Makro- und Mikroporosität unterscheiden lässt, als limitierender Faktor beschrieben. Neben der Notwendigkeit der Makroporen für das Einwachsen von Knochen bei einer Mindestgröße von 100 μm [54] haben die Mikroporen, bei einer Größe kleiner als 5 μm , eine Bedeutung für die Resorption der Keramik. Dabei werden Aufspaltungen an den Kristallgrenzen möglich, die mit einer Lösung der, die Kristalle im Gefüge haltenden, Brücken einhergeht. Somit können einzelne Kristalle aus dem Verbund gelöst und phagozytiert werden. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Makroporosität für den knöchernen Durchbau eines Implantates und die Mikroporosität für die Resorption entscheidend sind. Mit steigender Kristallinität und abnehmender Festigkeit zwischen den Partikeln nimmt die Phagozytose zu [78, 106]. Nach *Tadic* [100] nimmt mit abnehmender Kristallgröße aber auch die Degradation im Sinne der Löslichkeit und damit der Halisterese zu.

Zum Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit führten auch *Gomi et al.* [35] Untersuchungen durch. Bei *in vitro*-Versuchen mit Osteoklastenkulturen wurden Probekörper aus Hydroxylapatit mit unterschiedlicher Oberflächenrauheit untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Anzahl der anhaftenden resorbierenden Zellen an der rauen Oberfläche größer war als an einer glatten Oberfläche.

Mechanische *in vitro*- Experimente von *Chris Arts et al.* [17] zur Stabilität von Hüftpfannen im Rahmen von Aushebelversuchen nach Pfannendachaufbau mit verschiedenen Ersatzplastiken, konnten nach Zugabe von Ostim[®] eine verbesserte Standfestigkeit feststellen. Im Detail wies dabei die Behandlungsgruppen 25 % *Allogener Knochen* + 10 % Ostim[®] + 75% *Tricalciumphosphat- Hydroxylapatit- Granulat* höhere und die Behandlungsgruppe *Tricalciumphosphat- Hydroxylapatit- Granulat* + 10 % Ostim[®] sogar signifikant höhere Werte im Gegensatz zur Gruppe *Allogener Knochen allein* auf. Begründet wurden diese Ergebnisse mit einem kombinierten Effekt- resultierend aus verbesserter Implantat-Penetration und einem besseren interpartikulärem Verbund.

Aus diesen Arbeiten, welche zum einen die Porosität und zum anderen die Oberflächenstruktur untersuchten, kann man allgemein die Oberflächenbeschaffenheit als einen limitierenden Faktor der Integration einer Keramik bezeichnen.

In Bezug auf unsere Implantate ist festzustellen, dass wir bei der Herstellung auf ein gleich bleibendes Verhältnis zwischen Ostim[®] und den zugesetzten Knochenpartikeln unterschiedlicher Genese achteten. Damit war das Mengenverhältnis in allen behandelten Fällen gleich. Unbeeinflussbar blieb hingegen die Verteilung der Knochenpartikel im Implantat. Somit ist es natürlich denkbar, dass die Oberflächeneigenschaften durch an der Oberfläche liegende und in unterschiedlicher Anzahl vorkommende Knochenpartikel verschieden waren. Gleichwohl ließe sich dadurch ein Einfluss auf die Resorption und die Wirkung auf das Wirtslager ableiten und resümierend unsere beobachtete intensivere Osteogenese bevorzugt an den Grenzflächen zum knöchernen Transplantat erklären.

Als eine weitere Erklärung für die fehlende Integration können die Beobachtungen von *Weinländer et al.* [106] dienlich sein. Histologisch stellte die Arbeitsgruppe bei der Implantation einer Hydroxylapatit- Keramik fest, dass Implantatfragmente, die nicht direkt mit dem Lagerknochen in Kontakt standen, von kollagenfaserigen Septen eingeschleitet wurden und somit für die Knochenneubildung bedeutungslos waren. In deren Umgebung beobachteten sie vor allem Fremdkörperriesenzellen und geringe Rundzellinfiltrate, die als Zeichen einer Fremdkörperreaktion gewertet werden können.

Auch *Heisel* [43] beobachtete bei seinen Versuchen mit einer Suspension aus einem Hydroxylapatitgranulat (Korngröße zw. 50 – 150 µm) und verschiedenen Trägerlösungen eine offensichtliche Knochen- und Kallusbildung bei direktem Kontakt seiner Implantate mit dem ersatzstarken Lager am Versuchstier Kaninchen. Er leitete daraus einen deutlichen Einfluss der

Konstellation zwischen Implantat und Implantatbett auf die Osteogenese und Kallusbildung durch sein Hydroxylapatit- Granulat ab.

Schnettler [91], *Dingeldein* [24] und *Laschke et al.* [63] setzten, speziell für die erfolgreiche Integration von *Ostim*[®] aber auch für andere Knochenersatzstoffe, den direkten Kontakt des Implantates mit dem Lagerknochen voraus und machten darauf aufmerksam, dass ein Kontakt mit dem Lagerknochen für die Vaskularisierung des Defektgebietes und damit für die Integration von fundamentaler Bedeutung ist.

Reif et al. [78] postulierten, dass bei der Verbesserung der Revaskularisierungsbedingungen die Aussicht auf Erfolg bei der Anwendung von Implantatwerkstoffen steigen. Die Arbeitsgruppe um *Kilian et al.* [53] untersuchte in diesem Zusammenhang speziell die Angiogenese bei der Anwendung von *Ostim*[®] allein, in Verbindung mit dem Plasma- Transglutaminase-Faktor XIII und im Leerdefekt bei einem *critical-size-defect* an Ratten- Femora. Die Angiogenese in der Behandlungsgruppe *Ostim*[®] allein war dabei aber auf das *Interface* zwischen Lagerknochen und Implantat beschränkt. Ausgeprägter war die Angiogenese im Leerdefekt als auch in der Kombination mit dem zugegebenen Faktor XIII.

Somit scheint es nun möglich, die Fälle von Desintegration, die über den gesamten Versuchszeitraum, über alle Behandlungsgruppen hinweg auftraten, damit zu erklären, dass es sich bei *Ostim*[®] um eine pastöse Suspension handelt, die zwar einen formschlüssigen Kontakt mit dem Implantatbett in der distalen Metaphyse des Femur eingehen sollte, aber eben nicht wie ein „press fit“ Körper beurteilt werden kann. Es besteht keine Kontrolle über den postoperativen Kontakt.

Schnettler und Dingeldein [90] argumentieren konträr dazu mit der großen Oberfläche, die sich durch die Nanokristalle ergibt und ca. 100 m²/g beträgt. Damit ergibt sich ihrer Meinung nach ein sehr dichter Schluss zwischen *Ostim*[®] und dem umgebenden Knochenareal. Unterstützt wird dieser Aspekt der Oberflächengröße auch von *Stütze et al.* [98]: Ihrer Meinung nach wird generell die Integration eines Transplantates beschleunigt, je größer dessen Oberfläche in Bezug zum Transplantatvolumen steht. Sich anschließende Faktoren in dieser Argumentationskette sind die größere Angriffsfläche, eine akzelerierte Revaskularisierung sowie die gesteigerte Wirkung osteoinduktiver Faktoren.

Allgemeine Gültigkeit hat aber auch die Forderung an eine Implantation, Relativbewegungen zwischen Implantat und knöchernem Lager zu vermeiden. *Schenk* [89] als auch *Rueger* [85] setzen dies bei einer gewollten, erfolgreichen Integration im Allgemeinen als auch speziell für synthetische Kalziumphosphatkeramiken voraus. Kommt es dennoch zu solchen Relativbe-

wegungen, resultierten ein Einsprossen von Bindegewebe zwischen beide Komponenten und der bindegewebige Verschluss von möglichen Implantatporen ohne knöchernen Durchbau.

In unseren mikroskopischen Evaluierungen stellten wir weiterhin bei manchen Präparaten eine periostale bzw. endostale Kallusbildung mit einhergehender Ausdünnung der Kortikalis fest. Für die Kallusbildung selbst gibt es einige mögliche Erklärungen.

Eine Kallusformation und -bildung entsteht nach dem Verständnis von *Küntscher* [61] durch einen speziellen Reiz - den Reiz der Entzündung. Nach *Weinländer et al.* [106] sind die phagozytoseabhängige Bioresorptionen mit gleichzeitigen chronischen Entzündungserscheinungen verbunden. Somit können die von uns beobachteten Befunde an der Kortikalis, namentlich die Kallusbildung und Ausdünnung, damit in Zusammenhang gebracht werden: Die nanopartikuläre Struktur des *Ostim*[®] unterstützt die Resorption aufgrund seines Aufbaues im Rahmen der Phagozytose, löst damit eine Entzündungsreaktion aus und als Endergebnis resultiert die von uns beobachtete Kallusbildung als auch Ausdünnung der Kortikalis.

Die Entzündungsreaktionen selbst können dann wiederum positiv auf die Korrosion bzw. Resorption eines Implantates wirken [78].

In den beiden Behandlungsgruppen *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* bzw. *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* erhielten wir ein wiederholt heterogenes Bild der Resorption und Integration unserer Implantate. Eine Aufteilung der Untersuchungsergebnisse in zwei Gruppen war in der überwiegenden Anzahl der Untersuchungszeitpunkte möglich. Einerseits konnte ein jeweils komplett scholliger Zerfall der Implantate beobachtet werden und andererseits eine nur auf den Rand beschränkte Degradation mit partiellem Einscheiden des Implantates bzw. interponiertem Bindegewebe zwischen Implantat und umgebenden Knochen. Das eingebrachte autogene oder allogene Knochenmaterial unterlag entweder regen Resorptions- und Umbaureaktionen oder aber es blieb areaktiv als Bestandteil des Implantates im Zentrum des aufgefüllten Defektes liegen. Beim Vergleich des Verlaufes der Mittelwerte über die Versuchsdauer hinweg, zum Beispiel für die berechneten Knochenvolumina zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten, war der Unterschied zur Kontrollgruppe *Ostim*[®] *allein* bei der Gruppe *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* am kleinsten. Zueinander verhielten sich auch die beiden Augmentationsgruppen ähnlich. Jedoch konnte weder für den Zusatz von autogenem noch für allogenem Knochen ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass die Augmentationsgruppen im Durchschnitt zur Kontrollgruppe *Ostim*[®] *allein*, sich gleichende Ergebnisse in Hinblick auf die Befunde der Histologie und Histomorphometrie lieferten.

In der Literatur wurden unsere Ergebnisse bei Versuchen mit ähnlichen Untersuchungsansätzen bestätigt.

Thorwarth et al. untersuchten an Hausschweinen die knöcherne Regeneration von *Ostim*[®] allein und von *Ostim*[®] mit 25 % autogener *Spongiosa* im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe, in der nur *autogene Spongiosa allein* zugesetzt wurde. Nach 14 Tagen fanden sie, in Konkordanz zu unseren Befunden der Gruppe *Ostim*[®] allein, ebenfalls eine aus fibrösem Bindegewebe bestehende Schicht zwischen ihren Implantaten und dem umgebenden Knochen. Es zeigten sich gleichfalls Resorptionslakunen an der Oberfläche und partiell kam es zur Infiltration von Bindegewebe in das Implantat hinein. Nach 21 Tagen wurde vorwachsener, trabekulärer Knochen und im Zentrum verbliebene *Ostim*[®]- Fragmente beobachtet. Die späteren Zeitpunkte decken sich insofern nicht mehr mit unseren Befunden, da ein komplettes Ausfüllen der Defekte mit einer ebenso vollständigen Resorption von *Ostim*[®] unsererseits nicht evaluiert werden konnte. Die Gruppe *Ostim*[®] mit 25 % autogener *Spongiosa* bietet ein ähnliches Bild. Auch hier können wir die Befunde bis zum 21. Tag mit unseren Beobachtungen in Übereinstimmung bringen. Die später von dieser Arbeitsgruppe, zu zwei Drittel bzw. komplett, gefüllte Defektfläche mit Knochen konnten wir bei unseren Präparaten nicht ausmachen. Ein weiterer Aspekt der Übereinstimmung hingegen liegt in der Beobachtung der randständigen beginnenden und sich nach zentripetal ausdehnenden Knochenneubildung.

Prinzipiell ist der Zusatz von autogenem Knochengewebe als vorteilhaft zu bewerten. Dabei steht vor allem die Übertragung von funktionsfähigen Osteoblasten und deren Vorläuferzellen im Vordergrund. Diese sind für eine ausgeprägte Knochenneubildung verantwortlich. Da allerdings nur ein kleiner Teil der übertragenen Osteoblasten des Knochentransplantates überleben, sind es überwiegend die osteoblastären Vorläuferzellen, welche für eine Knochenneubildung und schnelle Regeneration von Knochendefekten sorgen [19, 71]. Doch wirken nach *Drenhaus et al.* [26] auf diese Vorläuferzellen die gleichen degenerativ wirkenden Ursachen ein wie auf die Osteoblasten.

Demnach müssten sich die positiven Eigenschaften bei der Augmentation mit autogener eigentlich auch in den Ergebnissen unserer Untersuchungen wieder finden lassen. Das ist vor allem erst am Endpunkt unseres Experimentes der Fall. Nach 12 Wochen können wir beim Vergleich der Mittelwerte für die Knochenflächen eindeutig feststellen, dass die Kombination von *Ostim*[®] mit autogenem Knochen einen größeren Anteil gegenüber den Gruppen *Ostim*[®] allein und *Ostim*[®] mit allogenen Knochen einnimmt. Diese Beobachtungen machten auch *Thorwarth et al.* [101].

Bei ihren Untersuchungen von *Ostim*[®] mit 25 % autogenem Knochen beobachteten sie zusätzlich, ebenso wie wir, eine verzögerte Resorption der Implantate. Einen Grund dafür vermuteten sie in der erhöhten Stabilität beim Zusatz von Spongiosa im Vergleich zu *Ostim*[®] allein.

Eine zusätzliche Beobachtung während unserer Operationen war das unterschiedliche Auftreten von Blutungen nach dem Setzen des Knochendefektes. Bei einigen Tieren kam es zu einer deutlichen Blutung aus der Spongiosa, bei anderen Tieren nicht. Diese Beobachtungen scheinen insofern von Bedeutung als dass durch die unmittelbare Nähe von Blutgewebe eine Regenerationskaskade durch Wachstumsfaktoren hervorgerufen werden kann. Verantwortlich dafür sind durch die Operation verletzte Blutgefäße. Diese rufen die Bildung von Fibrinkoagula durch zirkulierende Thrombozyten hervor, welche degranulieren und letztlich Wachstumsfaktoren und Zytokine freisetzen. Hauptsächlich handelt es sich dabei um die *PDGF* (Platelet derived growth factor) und *TGF β* (Transforming growth factor β). Diese wiederum sind wichtig für die Zelldifferenzierung und Zellproliferation der mesenchymalen Stammzellen [29]. Somit wäre es also denkbar, dass durch das unterschiedlich starke Auftreten von Blutungen während der Operation unsere heterogenen Befunde entstanden sind.

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass wir in allen Behandlungsgruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten eine mehr oder weniger ausgeprägte Integration und Resorption unserer Implantate sahen. In der überwiegenden Zahl der Fälle hatten wir innerhalb der Behandlungsgruppen eine Aufspaltung in zwei Lager: Entweder kam es zu einem komplett scholligen Zerfall des Implantates mit einer zentripetal gerichteten Knochenneubildung vom Lagerknochen aus oder aber es kam zu einer Ausbildung von Bindegewebe im Interface mit einer nur verzögerten Degradation der Implantate. Ebenso beobachteten wir Osteoklasten und vereinzelt Rundzellularinfiltrate.

Histomorphometrisch können wir von einer überlegenen Knochenneubildung innerhalb der ersten sechs Wochen bei der Anwendung von *Ostim*[®] allein sprechen. Histologisch konnte bereits nach zwei Wochen ein randständig beginnender Zerfall der Hydroxylapatitpaste beobachtet werden der von einer weiteren Knochenneubildung ins Zentrum des Defektes begleitet wurde. Einzig und allein in dieser Gruppe war eine kontinuierlich ansteigende Knochenneubildung evaluierbar. Bestand ein direkter Knochenkontakt, so ließ sich nur vereinzelt interpoliertes Bindegewebe ausmachen.

Der Zusatz von autogener Spongiosa hat in diesem Zeitraum zu keinen verbesserten Ergebnissen geführt. Die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte konnten erst zum Endpunkt nach zwölf Wochen anhand von Messungen zum Knochenflächenanteil gegenüber der

Gesamtfläche des Defektes bestätigt werden. Zu Beginn hingegen fiel diese Implantatgruppe gar mit einem kleiner werdenden Knochenflächenanteil auf. Histologisch war ebenfalls eine Einteilung des Einheilungsverhaltens in zwei unterschiedliche Gruppen möglich- einerseits bindegewebsfreie Degradation des Mischimplantates und andererseits bindegewebige Einheilung mit einem fast als areaktiv zu bezeichnenden Resorptionsprozess.

Ähnlich lassen sich die Ergebnisse beim Zusatz von allogenen Knochen zusammenfassen. Zu Beginn zeigt diese Behandlungsgruppe eine, zu Ostim[®] allein vergleichbar, größer werdende Knochenfläche. In der sechsten Wochen kommt es aber zu einer regredienten Entwicklung dieser Werte. Zu den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten nach acht und zwölf Wochen pendelt sich der Gehalt von neugebildetem Knochen auf einer gehobenen Ebene, vergleichbar zum Zusatz von autogenem Knochen, ein. Histologisch kann man auch hier eine randständige Knochenneubildung ausmachen. Interponiertes Bindegewebe kommt nur vereinzelt vor, so lang das Implantat Kontakt zum Wirtsknochen hat. Eine Zweiteilung der Befunde lässt sich analog zur Behandlungsgruppe mit autogenem Knochen erheben.

Das Gesamtbild der Ergebnisse dieser Versuchsanordnung lässt uns zum Schluss kommen, dass ein Zusatz von autogenem oder allogenen Knochengewebe die Einheilung von Ostim[®] weder negativ beeinflusst, noch statistisch verbessert.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen einer tierexperimentellen Verlaufsbeobachtung wurde das Einheilungsverhalten der nanopartikulären Hydroxylapatitpaste Ostim[®] allein und in Verbindung mit autogenem und allogenen Knochengewebe verglichen.

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über minimal zwei bis maximal zwölf Wochen. Insgesamt wurden jedem der 60 Weissen Neuseeländer Kaninchen zwei distale Femurdefekte mit einem Durchmesser von 4,0 mm gesetzt. Jeder dieser Knochendefekte wurde anschließend mit einem Implantat verschlossen. Für jedes Implantat standen zu jedem Untersuchungszeitpunkt vier Tiere und damit acht unterschiedliche Implantationsorte zur Verfügung. Es folgte nach Euthanasie und Entnahme der Femura samt Implantaten die Anfertigung von unentkalkten Dünnschliffen mit unterschiedlichen Färbungen. Für die histomorphometrische Evaluierung kam die Trichrom Färbung nach *Ladewig*, für die histomorphologische zusätzlich die Färbungen nach *Giemsa* und *Goldner*. Das Einheilungsverhalten der unterschiedlichen Präparate wurde nach der Degradation des Knochenersatzstoffes, der Knochenneubildung und dem Kontakt zwischen Implantat und Lagerknochen bewertet. Dabei stellte sich in jeder Untersuchungsgruppe ein heterogenes Bild der Ergebnisse dar. Entweder konnte ein komplett scholliger Zerfall der Implantate beobachtet werden oder es kam nur zu einer partiellen Degradation am Rand des Implantates mit ausgeprägter Bindegewebsneubildung im Interface zwischen Implantat und Knochen. Für die Untersuchungsgruppe *Ostim[®] allein* lässt sich festhalten, dass es hier zur einer sehr deutlichen und akzelerierten Knochenneubildung innerhalb der ersten sechs Wochen gegenüber den anderen Untersuchungsgruppen kam. Verantwortlich dafür sind die große Oberfläche aufgrund der nanopartikulären Zusammensetzung und pastöse Beschaffenheit, die eine schnelle Angiogenese zulässt. Zum Endpunkt nach zwölf Wochen wurde eine geringere Knochenneubildung (15,7%) gegenüber den Vergleichsgruppen (autogen: 20,6%; allogenen 20,3%) gemessen. Nachteilig erscheint die singuläre Anwendung von Ostim[®] in Hinblick auf eine Primärstabilität, so dass prinzipiell immer auf eine ausreichende Stabilität des Defektgebietes, z.B. in Kombination mit einer Osteosynthese, geachtet werden muss. *Ostim[®]/autogene Spongiosa* zeigte einen atypischen Verlauf der Knochenneubildung. Bis zur vierten Woche wurde eine Abnahme der Knochenfläche evaluiert. Zur sechsten Woche stieg die Knochenneubildung auf ein hohes Niveau (21,6%) und verblieb dort bis zum Ende der Untersuchung. Eine in der Literatur beschriebene Verbesserung des Einheilungsverhaltens durch die positiven Eigenschaften autogenen Knochengewebes, das in der Literatur als „Goldstandard“ des Knochenersatzes gilt [1, 2, 4, 7, 15, 19, 26, 38, 48, 52, 57, 85, 90], konnten wir nicht bestätigen. Durch den Zusatz autogenen Knochengewebes konnte aber die

Stabilität des Implantates bei der Implantation erhöht werden. *Ostim*[®]/*allogene Spongiosa* bot in den ersten sechs Wochen einen ähnlichen Verlauf wie *Ostim*[®] *allein*, jedoch mit einem geringeren Volumen neugebildeten Knochens. Nach der achten Woche konnte in dieser Untersuchungsgruppe die größte Knochenfläche (23,4%) gemessen werden. Nach der zwölften Woche glichen sich die Werte an die von *Ostim*[®]/*autogene Spongiosa* an. Eine Verbesserung der Knochenneubildung durch das osteokonduktiv wirkende Knochentransplantat konnten wir nicht quantifizieren. Eine Erhöhung der biologischen Wertigkeit des Implantates konnte somit nicht gefunden werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E: Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 33 (1995) 312-318
2. Aebi M: Biologischer oder artifizierter Knochenersatz? In: Huggler AH, Kuner EH (Hrsg): *Aktueller Stand beim Knochenersatz, Hefte zur Unfallheilkunde* 216. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1991, S. 1-9.
3. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 371 (2000) 10-27
4. Betz RR: Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 25 (2002) 561-570
5. Bischoff A: Knochentransplantation. Beilage zur Zeitschrift für Orthopädie 133 (1995) 1-8
6. Block MS, Kent JN: Healing of mandibular ridge augmentations using hydroxylapatite with and without autogenous bone in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 43 (1985) 3-7
7. Bloemers FW, TJ Blokhuis, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJ: Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 66 (2003) 526-531
8. Boeck-Neto RJ, Gabrielli MF, Shibli JA, Marcantonio E, Lia RC, Marcantonio E Jr.: Histomorphometric evaluation of human sinus floor augmentation healing responses to placement of calcium phosphate or Ricinus communis polymer associated with autogenous bone. *Clin Implant Dent Relat Res* 7 (2005) 181-188
9. Bolander ME, Balian G: The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *J Bone Joint Surg Am* 68 (1986) 1264-1274
10. Brewster NT, Gillespie WJ, Howie CR, Madabhushi SP, Usmani AS, Fairbairn DR: Mechanical considerations in impaction bone grafting. *J Bone Joint Surg Br* 81 (1999) 118-124
11. Bucholz RW: Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 395 (2002) 44-52
12. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R: Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 45 (1996) 371-386
13. Burchardt H: The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 174 (1983) 28-42
14. Burchardt H: Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18 (1987) 187-196
15. Burri C, Wolter D: Das komprimierte autologe Spongiosatransplantat. *Unfallheilkunde* 80 (1977) 169-175

16. Chang CS, Matukas VJ, Lemons JE: Histologic study of hydroxylapatite as an implant material for mandibular augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 41 (1983) 729-737
17. Chris Arts JJ, Verdonschot N, Schreurs BW, Buma P: The use of a bioresorbable nano-crystalline hydroxyapatite paste in acetabular bone impaction grafting. *Biomaterials* 27 (2006) 1110-1118
18. Claes LE, Wolf S, Ignatius AA: Mechanische Eigenschaften von biodegradablen Polymeren und Keramiken. *OP-Journal* 14 (1998) 230-233
19. Cypher TJ, Grossman JP: Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35 (1996) 413-417
20. Czitrom AA, Axelrod T, Fernandes B: Antigen presenting cells and bone allotransplantation. *Clin Orthop Relat Res* 197 (1985) 27-31
21. de Boer H: Early Research on Bone Transplantation. In: Aebi M, Regazzoni P (Hrsg): *Bone Transplantation*, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1989, S. 7-19.
22. de Groot K: Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* 1 (1980) 47-50
23. Dingeldein E, Donath K: Einheilung einer porösen Hydroxylapatit- Keramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen. *Osteosynthese international* 2 (1994) 112-116
24. Dingeldein E, Engart B: Ostim[®] -Paste Produktinformation. (2001) Osartis GmbH & Co. KG, Obernburg
25. Draenert K, Wiese FG, Garde U, Draenert Y, Helber U, Bömer M: Synthetische Knochenersatzwerkstoffe auf HA- und TCP- Basis. *Trauma und Berufskrankheit* 3 (2001) 293-300
26. Drenhaus U, Imhoff M, Tassler H: Über lagerungsbedingte Veränderungen autologer Spongiosa. *Unfallchirurg* 91 (1988) 165-173
27. Eggli PS, Mueller W, Schenk R: The role of pore size on bone ingrowth and implant substitution in Hydroxylapatit and Tricalcium phosphat ceramics. A histologic and morphometric study in rabbits. In: A Pizzoferrato, Marchetti PG, Ravaglioli A, Lee AJC (Hrsg): *Biomaterials and Clinical Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1987, S. 53-56.
28. Eggli PS, Müller W., Schenk RK: Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop Relat Res* 232 (1988) 127-138
29. Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl (1998) 7-21

30. Eitel F, Schweiberer L, Saur K, Dambe LT, Klappe F: Theoretische Grundlagen der Knochentransplantation: Osteogenese und Revaskularisation als Leistung des Wirtslagers. In: Hierholzer G, Zilch H (Hrsg): Transplantatlager und Implantatlager bei verschiedenen Operationsverfahren, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1980, S.
31. Fehr M: Tierschutzrechte Euthanasie bei Kaninchen, Meerschweinchen, kleinen Nagern und Reptilien. *Prakt. Tierarzt* 2 (2002) 128-136
32. Frame JW, Browne RM, Brady CL: Hydroxyapatite as a bone substitute in the jaws. *Biomaterials* 2 (1981) 19-22
33. Frame JW, Rout PG, Browne RM: Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *J Oral Maxillofac Surg* 45 (1987) 771-778
34. Friedlaender GE: Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res* 174 (1983) 58-68
35. Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G, Davies JE: Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 14 (1993) 91-96
36. Gross TP, Cox QG, Jinnah RH: History and current application of bone transplantation. *Orthopedics* 16 (1993) 895-900
37. Gumaer KI, Sherer AD, Slighter RG, Rothstein SS, Drobeck HP: Tissue response in dogs to dense hydroxylapatite implantation in the femur. *J Oral Maxillofac Surg* 44 (1986) 618-627
38. Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W: Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen. Tierexperimentelle Untersuchung. *Orthopäde* 27 (1998) 105-117
39. Gürtler L: Übertragbarkeit von Infektionserregern über allogene Knochentransplantate. In: Schnettler R, Markgraf E (Hrsg): Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren, Thieme, Stuttgart New York, 1997, S. 8-11.
40. Hanslik L: Der klinische Wert des Knochentransplantates. *Langenbecks Arch Chir* 329 (1971) 996-1005
41. Harvey WK, Pincock JL, Matukas VJ, Lemons JE: Evaluation of a subcutaneously implanted hydroxylapatite-avitene mixture in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 43 (1985) 277-280
42. Hein W, Reichel H, Bernstein A: Hydroxylapatit in der Hüftendoprothetik. In: Puhl W (Hrsg): Bioceramics in Orthopaedics – New Applications, Ferdinand Enke, Stuttgart, 1998, S. 79-81.
43. Heisel J: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kallusformation durch Hydroxylapatit-Injektion. *Unfallchirurgie* 13 (1987) 179-186
44. Helber MU, Ulrich C: Metaphysärer Defektersatz mit Hydroxylapatitkeramik. 3-bis 4-Jahresnachuntersuchungs-Ergebnisse. *Unfallchirurg* 103 (2000) 749-753

45. Hofman GO, Lob G: Knochenbanken und allogene Knochentransplantation beim Menschen. In: Huggler AH, Kuner EH (Hrsg): Aktueller Stand beim Knochenersatz, Hefte zur Unfallheilkunde 216. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1991, S. 35-44.
46. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *J Orthop Res* 5 (1987) 114-121
47. Horowitz MC, Friedlaender GE: Induction of specific T-cell responsiveness to allogeneic bone. *J Bone Joint Surg Am* 73 (1991) 1157-1168
48. Huber FX, McArthur N, Hillmeier J, Kock HJ, Baier M, Diwo M, Berger I, Meeder PJ: Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinical results. *Arch Orthop Trauma Surg* 126 (2006) 533-540
49. Ignatius AA, Claes LE: In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17 (1996) 831-839
50. Jerosch J, Castro WH, Granrath M, Rosin H: Knochenbanken in der BRD. Ergebnisse einer Befragung. *Unfallchirurg* 93 (1990) 334-338
51. Katthagen BD: Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien. Hefte zur Unfallheilkunde 178 (1986) 1-163
52. Katthagen BD: Bedeutung der Knochentransplantation in der Orthopädischen Chirurgie. In: Pesch H J, Stöss H, Kummer B (Hrsg): Osteologie Aktuell VII, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1993, S. 151-153.
53. Kilian O, Fuhrmann R, Alt V, Noll T, Coskun S, Dingeldein E, Schnettler R, Franke RP: Plasma transglutaminase factor XIII induces microvessel ingrowth into biodegradable hydroxyapatite implants in rats. *Biomaterials* 26 (2005) 1819-1827
54. Klawitter JJ, Hulbert SF: Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res* 5 (1971) 161-229
55. Klein CP, Driessen AA, de Groot K, van den Hooff A: Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 17 (1983) 769-784
56. Knaepler H, Koch F, Bugany H: Untersuchungen zur HIV-Inaktivierung in allogenen Knochentransplantaten durch chemische Desinfektion und radioaktive Bestrahlung. *Unfallchirurgie* 18 (1992) 1-6
57. Knaepler H, von Garrell T, Gürtler L: Die allogene Knochentransplantation- eine aktuelle Standortbestimmung. *Deutsches Ärzteblatt* 91 (1994) 798-804
58. Köster K, Karbe E, Kramer H, Heide H, König R: Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Calciumphosphat-Keramik. *Langenbecks Arch Chir* 341 (1976) 77-86

59. Köster K, Ehard H, Kubicek J, Heide H: Experimentelle Anwendung von Kalziumphosphatgranulat zur Substitution von konventionellen Knochentransplantaten. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 117 (1979) 398-403
60. Kübler NR: Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1 (1997) 2-25
61. Küntscher G: Primäre Knochenheilung. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir* 308 (1964) 452-458
62. Ladewig P: Über eine einfache und vielseitige Bindegewebsfärbung. *Zeitschr. f. wiss.Mikrosk.* 55 (1938) 215-217
63. Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD: Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82 (2007) 494-505
64. Lexer E: Die freien Transplantationen. *Neue Deutsche Chirurgie* 26b (1924)
65. Liebendörfer A, Tröster S: Hydroxylapatitkeramik im klinischen Einsatz. Histologische Befunde von 23 Patienten. *Unfallchirurgie* 23 (1997) 60-68
66. Mai R, Reinsdorf A, Pilling E, Lauer G, Gelinsky M, Eckelt U: Frei modellierbare Hydroxylapatit-Kollagen-Komposite zur Sanierung ossarer Defekte. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9 (2005) 12-17
67. Matti H: Über die freie Transplantation von Knochenspongiosa. *Langenbecks Arch klin. Chir.* 168 (1932) 236-258
68. Mittelmeier H, Mittelmeier W: Moderne Entwicklung von Knochenersatzmaterialien. In: Huggler AH, Kuner EH (Hrsg): *Aktueller Stand beim Knochenersatz*, Hefte zur Unfallheilkunde 216. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1991, S. 69-84.
69. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71 (2001) 354-361
70. Müller RT: Knochentransplantation und AIDS. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 127 (1989) 527-529
71. Muschler GF, Lane JM: Orthopedic Surgery. In: Habal MB, Reddi AH (Hrsg): *Bone grafts and bone substitutes*, Saunders, Philadelphia, 1992, S. 375-407.
72. Niedhart C, Niethard FU: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Puhl W (Hrsg): *Bioceramics in Orthopaedics - New Applications*, Ferdinand Enke, Stuttgart, 1998, S. 46-50.
73. Orr TE, Villars PA, Mitchell SL, Hsu HP, Spector M: Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials* 22 (2001) 1953-1959
74. Osborn JF, Weiss T: Hydroxylapatitkeramik--ein knochenähnlicher Biowerkstoff (vorläufige Mitteilung). *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 88 (1978) 1166-1172

75. Osborn JF: Die physiologische Integration von Hydroxylapatitkeramik in das Knochengewebe. Hefte zur Unfallheilkunde 174 (1985) 101-105
76. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS: Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 72 (1983) 1396-1409
77. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 (1987) 595-610
78. Reif D, Leuner B, Hotz G: Temporäre Knochenersatzmaterialien auf Basis von Calciumphosphat. In: Claes L, Ignatius AA (Hrsg): *Biodegradierbare Implantate und Materialien*, Hefte zu "Der Unfallchirurg" 265. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1998, S. 270-277.
79. Renooij W, Hoogendoorn HA, Visser WJ, Lentferink RH, Schmitz MG, van Leperen H, Oldenburg SJ, Janssen WM, Akkermans LM, Wittebol P: Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora. A pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 197 (1985) 272-285
80. Romeis B: *Mikroskopische Technik*. Böck P, 17. Aufl. Urban und Schwarzenberg, München, 1989
81. Rothstein SS, Paris DA, Zacek MP: Use of hydroxylapatite for the augmentation of deficient alveolar ridges. *J Oral Maxillofac Surg* 42 (1984) 224-230
82. Rübsamen-Waigmann H: Virussicherheit von Blutspenden und Knochentransplantaten. In: Schnettler R, Markgraf E (Hrsg): *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*, Thieme, Stuttgart New York, 1997, S. 1-7.
83. Rueger J M: Synthetisch resorbierbare Materialien: Eine Alternative zum Transplantat. In: Claes L, Ignatius AA (Hrsg): *Biodegradierbare Implantate und Materialien*, 265. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1998, S. 261-269.
84. Rueger JM: *Knochenersatzmittel*. Hefte zur Unfallheilkunde. 213 Springer, Berlin Heidelberg New York, 1992
85. Rueger JM: *Knochenersatzmittel*. State of the art und: Wohin gehen wir? *Unfallchirurg* 99 (1996) 228-236
86. Rueger JM: *Knochenersatzmittel*. Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* 27 (1998) 72-79
87. Rueger JM, Linhart W, Sommerfeldt D: Biologische Reaktionen auf Kalziumphosphatkeramik-Implantationen. Tierexperimentelle Ergebnisse. *Orthopäde* 27 (1998) 89-95
88. Sachs L, Hedderich J: *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*. 12. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2006

89. Schenk RK: Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen. In: Huggler AH, Kuner EH (Hrsg): Aktueller Stand beim Knochenersatz, Hefte zur Unfallheilkunde 216. Berlin Heidelberg New York, 1991, S. 23-35.
90. Schnettler R, Dingeldein E: Inorganic bone substitutes. In: Lewandrowski KU, Wise DL, Trantolo DJ, Gresser JD, Yaszemski MJ, Altobelli DE (Hrsg): Tissue engineering and biodegradable equivalents: scientific and clinical applications, Marcel Dekker Inc., New York Basel, 2002, S. 401-432.
91. Schnettler R, Stahl JP, Alt V, Pavlidis T, Dingeldein E, Wenisch S: Calcium Phosphate-Based Bone Substitutes. Eur J of Trauma 30 (2004) 219-229
92. Schweiberer L: Neuere Ergebnisse zur Knochenregeneration und ihre klinische Bedeutung. Langenbecks Arch Chir 329 (1971) 986-996
93. Schweiberer L: Theoretisch-experimentelle Grundlagen der autologen Spongiosatransplantation im Infekt. Unfallheilkunde 79 (1976) 151-155
94. Schweiberer L, Stützele H, Mandelkow HK: Bone transplantation. Arch Orthop Trauma Surg 109 (1990) 1-8
95. Shors EC: The development of coralline porous Ceramic bone graft substitutes. In: Laurencin CT (Hrsg): Bone graft substitutes, ASTM International, West Conshohocken, 2003, S. 271-288.
96. Soldner E, Herr G: Knochen, Knochentransplantate, Knochenersatzmaterialien. Trauma und Berufskrankheit 3 (2001) 256-269
97. Spector M: Charakterisierung biokeramischer Kalziumphosphatimplantate. In: Huggler AH, Kuner EH (Hrsg): Aktueller Stand beim Knochenersatz, Hefte zur Unfallheilkunde 216. Berlin Heidelberg New York, 1991, S. 11-22.
98. Stützele H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L: Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien. Orthopäde 27 (1998) 118-125
99. Tadic D, Peters F, Epple M: Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. Biomaterials 23 (2002) 2553-2559
100. Tadic D, Epple M: A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. Biomaterials 25 (2004) 987-994
101. Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA: Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. J Oral Maxillofac Surg 63 (2005) 1626-1633
102. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM: The bone induction principle. Clin Orthop Relat Res 53 (1967) 243-283
103. von Garrel T, Gotzen L: Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking. Unfallchirurg 101 (1998) 713-727

104. Voor MJ, White JE, Grieshaber JE, Malkani AL, Ullrich CR: Impacted morselized cancellous bone: mechanical effects of defatting and augmentation with fine hydroxyapatite particles. *J Biomech* 37 (2004) 1233-1239
105. Voor MJ, Arts JJ, Klein SA, Walschot LH, Verdonshot N, Buma P: Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 71 (2004) 398-407
106. Weinländer M, Grundschober F, Plenk H jr.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Auffüllung von Knochendefekten mit Hydroxylapatitkeramik. *Z Stomatol* 84 (1987) 195-205
107. Wilke A, Orth J, Landgraff M, Griss P: Biokompatibilitätstestung von Keramiken im Vergleich zu Metallen und Polymeren mit Hilfe einer humanen Knochenmarkzellkultur. In: Schnettler R, Markgraf E (Hrsg): *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*, Thieme, Stuttgart New York, 1997, S. 111-117.
108. Williams DF: *Definitions in Biomaterials*. Elsevier, Amsterdam, 1987
109. Wippermann BW, Schratt HE, Steeg S, Tscherne H: Komplikationen der Spongiosaentnahme am Beckenkamm. Eine retrospektive Analyse von 1191 Fällen. *Chirurg* 68 (1997) 1286-1291
110. Wolff J: *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Reprint der Ausg. Berlin, Hirschwald, 1892. Wessinghage D, Schattauer, Stuttgart, 1991
111. Yamazaki Y, Oida S, Akimoto Y, Shioda S: Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of Paris. *Clin Orthop Relat Res* 234 (1988) 240-249

Untersuchungen zur Osteointegration einer nanopartikulären Hydroxylapatitkeramik in Verbindung mit verschiedenen Knochengeweben am Kaninchen

THESEN
zur
Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin an
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mathias Schulz
geboren am: 16.07.1977 in Karl-Marx-Stadt

1. Autogenes Knochengewebe wirkt osteoinduktiv und ist bei der Therapie von Knochendefekten bis heute das Verfahren mit der besten Regenerationspotenz.
2. Die Spongiosaentnahme als Zweiteingriff am Beckenkamm kann Komplikationen wie Parästhesien, Frakturen und Infektionen verursachen und führt häufig zu langfristigen Beschwerden.
3. Bei Verwendung allogenen Knochengewebes ist kein Zweiteingriff erforderlich, jedoch verbleibt auch nach entsprechender Prozessierung ein Infektionsrisiko. Allogener Knochen wirkt im Gegensatz zum autologen Transplantat nur als osteokonduktive Leitstruktur.
4. Knochenersatzstoffe bieten bei der Behandlung von Knochendefekten eine Alternative mit uneingeschränkter Verfügbarkeit. Ein idealer Knochenersatzstoff sollte nach Einbringen im gleichen Maße resorbiert werden wie sich neuer Knochen im Defektgebiet bildet. Bei nicht resorbierbaren Substanzen muss zum dauerhaften Ersatz eine Stabilität durch Einwachsen des umgebenden Knochens erreicht werden. Hydroxylapatit wird vor diesem Hintergrund durch seine in zahlreichen Studien belegte, gute Biokompatibilität am häufigsten als Knochenersatzstoff eingesetzt.
5. In der vorliegenden Arbeit wurde ein nanopartikulärer Hydroxylapatit (*Ostim*[®]) in Verbindung mit autogenem und allogenen Knochengewebe auf sein Einheilungsverhalten untersucht. Die Substanz wird als wässrige Suspension von pastöser Konsistenz implantiert.
6. Das Kaninchen ist als Versuchstier und reproduzierbares Tiermodell zur Beurteilung von Knochenregeneration und Implantateinheilung aus zahlreichen Studien bekannt. Als Defektmodell wurde ein Bohrloch mit einem Durchmesser von 4,0 mm an der distalen Femurmetaphyse gewählt. In den Defekt wurde die Hydroxylapatitpaste in Kombination mit autogenem oder allogenen Knochengewebe implantiert.

7. Die Untersuchung des Einheilungsverhaltens erfolgte in Abhängigkeit vom physiologischen Verlauf der Osteogenese nach 2 Wochen, 4 Wochen, 6 Wochen, 8 Wochen und 12 Wochen. Nach diesen Versuchszeiten wurden Dünnschliffe angefertigt und mit der Trichrom-Goldner- Färbung, der Ladewig- Färbung und der Giemsa- Färbung zur histologischen Auswertung vorbereitet.
8. Die angefärbten Präparate wurden zur Auswertung der Knochenneubildung im Defekt und der knöchernen Einheilung der Implantate sowohl histomorphologisch als auch histomorphometrisch untersucht.
9. Histomorphologisch konnte eine knöcherne Integration von Ostim[®] nur teilweise beobachtet werden. In allen Versuchsgruppen traten große interindividuelle Unterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen auf. Ausgedehnte Fremdkörperreaktionen oder Entzündungsreaktionen gegenüber Ostim[®] wurden nicht beobachtet.
10. Die statistische Auswertung der Histomorphometrie ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Implantatkombinationen.
11. Die Augmentation von Ostim[®] mit autogenem oder allogenen Knochengewebe zeigt im Gegensatz zur Anwendung von Ostim[®] allein keinen Unterschied in Bezug auf den morphologischen Verlauf der knöchernen Einheilung.

Lebenslauf

Name: Schulz

Vorname: Mathias

Geburtsdatum/- ort: Karl-Marx-Stadt

Familienstand: ledig

Eltern: Dipl. Ing. Wolfgang Schulz
Gisela Schulz, Lehrerin

Geschwister: Steffen Schulz
Karsten Schulz

Schulbildung:

09/1984- 09/1991 POS „Paul Hermann“ in Hettstedt

09/1991-09/1992 Gymnasium „Am Markt“ in Hettstedt

09/1992-06/1996 Landesschule Pforta, Schulpforte

07/1996-04/1997 Sanitäter, Panzeraufklärungsbataillon 2,
Hessisch Lichtenau

Ausbildung:

10/1997- 04/2006 Studium der Humanmedizin an der
Georg-August-Universität Göttingen
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Universität Zürich

04/2002 Ärztliche Vorprüfung

04/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2005-07/2005 Klinik für Innere Medizin
BG Klinik Bergmannstrost
Merseburger Str.162, Halle
Direktor: PD Dr. med. J. Barth

08/2005-11/2005 Chirurgische Klinik
Kantonsspital Winterthur
Brauerstrasse 15, Winterthur
Direktor: Prof. Dr. med. M. Decurtins

12/2005-03/2006	Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Therapie Magdeburger Str.22, Halle Direktor: Prof. Dr. med. habil W. Hein
04/2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 01/2007	Tätigkeit als Assistenzarzt an der Universitätsklinik und Poliklinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Publikationen

Schulz M, Brand S, Brandt J: Defect Healing using Nanoparticulate Hydroxyapatite in Combination With Autogeneic and Allogeneic Bone in a Animal Model, Tohoku J. Exp. Med. (in Arbeit)

Vorträge

Schulz M, Brandt J, Brehme K, Raum K: Monitoring of elastic properties during bone regeneration

2ND European Symposium on **Ultrasonic Characterization of Bone** (2007) Halle

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation

**Untersuchungen zur Osteointegration einer nanopartikulären Hydroxylapatitkeramik
in Verbindung mit verschiedenen Knochengeweben am Kaninchen**

selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu
haben.

Halle/Saale, im September 2007

Mathias Schulz

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation

**Untersuchungen zur Osteointegration einer nanopartikulären Hydroxylapatitkeramik
in Verbindung mit verschiedenen Knochengeweben am Kaninchen**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.) erstmalig
einreiche.

Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Halle/Saale, im September

Mathias Schulz

Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit entstand an der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Hein,
dem ich für die Überlassung des Themas danke.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Jörg Brandt für die Unterstützung und Beratung während der Bearbeitung des Themas.

Darüber hinaus gilt es, den Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Orthopädie meinen Dank auszusprechen. Namentlich Frau Angela Rosemeier für die Organisation und Unterstützung während der Operationen, Frau Cornelia Vetter für die Anfertigung der histologischen Färbungen.

Weiterhin habe ich Herrn Alexander Weissmann für die Hilfe als Operationsassistent zu danken.

Nicht zu letzt möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie für die kritischen Fragen, die Aufmunterung und Motivationen rund um die Erstellung dieser Arbeit bedanken.